

Asetaalisuojaukset oligonukleotidisynteesissä

Niko Raisio

Pro gradu -tutkielma

Kemian koulutusohjelma

Helsingin yliopisto

18.3.2020



HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

MATEMAATTIS-LUONNONTIEDELLINEN TIEDEKUNTA
MATEMATISK-NATURVETENSKAPLIGA FAKULTETEN
FACULTY OF SCIENCE

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree programme Kemian koulutusohjelma	
Tekijä – Författare – Author Niko Raisio			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Asetaalisuojaukset oligonukleotidisynteesissä			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma	Aika – Datum – Month and year Maaliskuu 2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 54	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Orgaanisen molekyylin hydroksyyliyhdytys voidaan suojata asetaalina. Asetaali on happolabiili, ja asetaalina suojattu hydroksyyli voidaan vapauttaa esimerkiksi happohydrolyysillä. Asetaalisuojauksen rakennetta muuttamalla voidaan vaikuttaa sen happostabiilisuuteen sekä suojatun molekyylin lipofiilisyyteen ja kiraalisuuteen.</p> <p>Tämän tutkielman kirjallisuusosassa esitellään erilaisia asetaalisuojaryhmiä ja niiden käyttökohteita oligonukleotidisynteesissä. Päähuomio on suojaryhmien happohydrolyysiominaisuuksissa ja happamien olosuhteiden mahdollisissa haittavaikutuksissa. Haittavaikutuksia voivat olla esimerkiksi fosfaatin migraatio, oligonukleotidiketjun katkeaminen, depurinaatio ja väärän suojaryhmän irtoaminen. Asetaalisuojauksen poistamiseen käytettyjen olosuhteiden havaitaan muuttuneen selvästi aiempaa miedommiksi. Tämän mahdollistaa esimerkiksi asetaalisuojauksen rakenteen muuttuminen synteesin aikana. Asetaalisuojausta on käytetty eniten 2'-hydroksyylin suojaamiseen. Siinä sen tehtävänä on ohjata fosfaatti 3'-hydroksyyliin ja estää sen migraatio synteesin loppuun asti. 5'-hydroksyyli on perinteisesti suojattu muilla happolabiileilla suojaryhmillä. 5'-O-asetaalisuojaus voisi olla perinteisiä suojaryhmiä parempi vaihtoehto helpomman poistettavuutensa vuoksi, mutta käytännön sovelluksia ei esitetä. 3'-hydroksyylin suojaamista asetaalina on käytetty DNA:n monistamiseen PCR-tekniikalla. 2'- ja 3'-hydroksyyli voidaan suojata myös syklikenä asetaalina. Tätä on käytetty terminaalisen nukleosidin suojaamiseen liuoksessa tapahtuvassa oligonukleotidisynteesissä.</p> <p>Kokeellisessa osassa valmistettiin 5'-O-2-isopropoksiopropan-2-yylinä suojattuja 2'-deoksiadenosiinia, -sytidiiniä ja -guanosiinia. Ensin nukleosidien 3'- ja 5'-hydroksyyli suojattiin <i>tert</i>-butyylidimetyylisilyylillä. 5'-O-suojaus poistettiin selektiivisesti fosfomolybdeenihapolla tai trikloorietikkahapolla. Asetaalisuojaryhmä liitettiin vedettömissä olosuhteissa reaktiolla 2-isopropyylioksiopropeenin kanssa <i>para</i>-tolueenisulfonihapon katalysoimana. Lopuksi 3'-O-silyyli poistettiin tetrabutylammoniumfluoridilla. Silyylin liittäminen oli helppo ja suoraviivainen reaktio, ja lisäksi siinä oli hyvä saanto. Selektiivinen silyylin poisto oli helppo ja kohtalaisen nopea suorittaa, mutta saannot olivat välttäviä. Paremmalle menetelmälle olisikin tarvetta. Asetaalisuojauksen liittäminen oli niin nopea reaktio, että sen kulkua ei voitu seurata. Reaktion tiedettiin jäävän kesken, jos reaktioaika on liian lyhyt tai katalyytin määrä on liian pieni. Toisaalta, liian pitkän reaktioajan tai liian suuren katalyytin määrän tiedettiin hajottavan asetaalin. Reaktioaika pidettiin vakiona ja sopiva katalyytin määrä pyrittiin selvittämään testireaktioilla. Saannot jäivät tyydyttäväiksi. Testireaktiot ja vedettömät reaktio-olosuhteet tekivät tästä välivaiheesta hieman muita työläämmän. 3'-O-silyylin poistaminen oli suoraviivainen ja helposti toteutettava reaktio, jossa saannot olivat pääasiassa hyviä. Synteesireitin kokonaissaanto jäi useiden välivaiheiden vuoksi välttäväksi. Tämän synteesireitin saantoa voitaisiin parantaa välivaiheita kehittämällä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Asetaali, suojaryhmä, oligonukleotidi			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto HELDA			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

Lyhenneluettelo	V
KIRJALLISUUSOSA	1
1 Johdanto	1
2 Nukleosidin 2'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina	2
2.1 Vaihtoehtoiset suojaryhmät 2'-hydroksyytille	2
2.2 Oligonukleotidin happolabiilisuuden vaikutus suojaryhmän valintaan	4
2.3 Asetaalin happolabiilisuuteen vaikuttaminen	4
2.4 Nukleosidin 2'- <i>O</i> -asetalisuojaryhmät ja niiden kehittyminen	5
2.5 Hydrolyysiominaisuuksien kehittyminen	5
2.6 Muita keinoja poistaa 2'- <i>O</i> -asetalisuojaus	13
2.7 Selektiiviset menetelmät 2'-hydroksyyli ryhmän asetaalisuojaukseen	14
3 Nukleosidin 5'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina	16
3.1 Trityyli johdokset 5'-hydroksyylin suojaamisessa	17
3.2 Asetalisuojaryhmien käyttötavat 5'-hydroksyylin suojaamisessa	18
3.3 Selektiiviset menetelmät 5'-hydroksyyli ryhmän asetaalisuojaukseen	22
4 Nukleosidin 3'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina	22
4.1 3'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina PCR-menetelmässä	22
4.2 Selektiiviset menetelmät 3'-hydroksyyli ryhmän asetaalisuojaukseen	24
5 Nukleosidin 2'- ja 3'-hydroksyylien suojaaminen syklisenä asetaalina	26
KOKEELLINEN OSA	30
6 Johdanto	30
7 Tulokset ja tulosten tarkastelu	31
8 Menetelmät	34
8.1 Yleiset menetelmät	34

8.2	2'-deoksinukleosidien 3',5'-bis-silyloiminen	34
8.2.1	3',5'- <i>O</i> -di(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini	34
8.2.2	<i>N</i> ⁶ -bentsoyyli-3',5'- <i>O</i> -di(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini	35
8.2.3	3',5'- <i>O</i> -di(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi- <i>N</i> ² -isobutyryylyguanosiini	36
8.2.4	<i>N</i> ⁴ -bentsoyyli-3',5'- <i>O</i> -di(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksisytidiini	37
8.3	3',5'- <i>O</i> -di(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksinukleosidien selektiivinen 5'-desilyloiminen	38
8.3.1	3'- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini	38
8.3.2	<i>N</i> ⁶ -bentsoyyli-3'- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini	39
8.3.3	3'- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi- <i>N</i> ² -isobutyryylyguanosiini	40
8.3.4	<i>N</i> ⁴ -bentsoyyli-3'- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksisytidiini	41
8.4	3'- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksinukleosidien 5'-hydroksyylin asetalisuojaaminen 2-isopropylioksipropeenilla	42
8.4.1	<i>N</i> ⁶ -bentsoyyli-3'- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi- 5'- <i>O</i> -(2-isopropoksisipropan-2-yl)adenosiini	42
8.4.2	3'- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi- <i>N</i> ² -isobutyryyli- 5'- <i>O</i> -(2-isopropoksisipropan-2-yl)guanosiini	43
8.4.3	<i>N</i> ⁴ -bentsoyyli-3'- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi- 5'- <i>O</i> -(2-isopropoksisipropan-2-yl)sytidiini	44
8.5	3'- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi- 5'- <i>O</i> -(2-isopropoksisipropan-2-yl)nukleosidien 3'-desilyloiminen	46
8.5.1	<i>N</i> ⁶ -bentsoyyli-2'-deoksi-5'- <i>O</i> -(2-isopropoksisipropan-2-yl)adenosiini	46
8.5.2	2'-deoksi- <i>N</i> ² -isobutyryyli-5'- <i>O</i> -(2-isopropoksisipropan-2-yl)guanosiini	47
8.5.3	<i>N</i> ⁴ -bentsoyyli-2'-deoksi-5'- <i>O</i> -(2-isopropoksisipropan-2-yl)sytidiini	48
8.6	3'- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiinin <i>N</i> ⁶ :n suojaaminen bentsoyylikloridilla	50
8.7	2-isopropylioksipropeeni	51

8.8 Fosfomolybdeenihapon (PMA) kidevesien ja vesipitoisuuden määrittäminen NMR-spektristä.....	51
Viiteluettelo	52

Lyhenneluettelo

ALE	asetaalilevulinyyliesteri
BzCl	bentsoyylikloridi
CAL-B	<i>Candida antarctica</i> B
DCA	dikloorietikkahappo
DCM	dikloorimetaani
DMF	dimetyyliformamidi
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DMTr	dimetoksitrityyli
DNA	deoksiribonukleiinihappo
dNTP	deoksinukleosiditrifosfaatti
dTTP	tymidiinitrifosfaatti
CTMP	1-(2-kloori-4-metyylifenyyli)-4-metoksipiperidi-4-nyyli
DBU	1,8-diatsabisykloundek-7-eeni
HBOE	1-((4-hydroksibentsyyli)oksi)etyyli
FPMP	1-(2-fluorifenyyli)-4-metoksipiperidi-4-nyyli
FNEBE	1-((3-fluori-4-((2-(4-nitrofenyyli)etoksi)karbonyyli)oksi)bentsyyli)oksi)- etyyliasetali
LCAA-CPG	long-chain alkylamino controlled pore glass
MCH	1-metoksisykloheksyyli
MDMP	3-metoksi-1,5-dikarbometoksipentanyyli
MIP	2-metoksi-isopropyyli
MTHP	4-metoksitetrahydropyranyyli
NaCit.	natriumsitraatti
NBM	((2-nitrobentsyyli)oksi)metyyli
NEBE	1-((4-((2-(4-nitrofenyyli)etoksi)karbonyyli)oksi)bentsyyli)oksi)etyyliasetali
NMR	ydinmagneettinen resonanssi
NPE	2-(4-nitrofenyyli)etyyli
NPEOC	(2-(4-nitrofenyyli)etoksi)karbonyyli
Py	pyridiini
RNA	ribonukleiinihappo

TBAF	tetrabuttyliammoniumfluoridi
TBSCl	<i>tert</i> -buttylidimetyylisilyylikloridi
TCA	trikloorietikkahappo
TEA	trietyyliamiini
THF	tetrahydrofuraani
THF	tetrahydrofuranyyli
THP	tetrahydropyranyyli
TMSCl	trimetyylisilyylikloridi
tris	2-amino-2-(hydroksimetyyli)propaani-1,3-dioli
TsOH	<i>para</i> -tolueenisulfonihappo
PCR	polymeraasiketjureaktio
PMA	fosfomolybdeenihappo

KIRJALLISUUSOSA

1 Johdanto

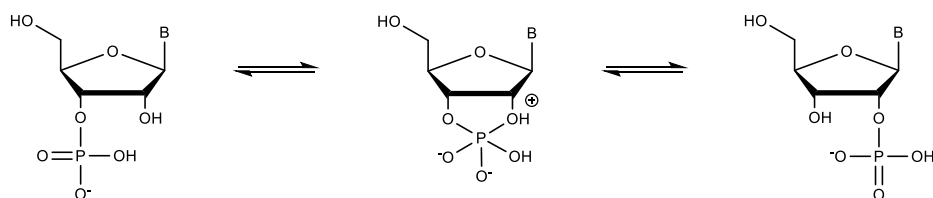
Oligonukleotidisynteesissä eri nukleosidit tulee saada liittymään toisiinsa oikeassa järjestyksessä ja oikeanlaisilla sidoksilla. Valmiissa oligonukleotidiketjussa nukleosidin 3'- ja 5'- hydroksyyli-tylit ovat kiinnittyneet fosfaattiesterisidosten välityksellä viereisiin nukleosideihin. Oligonukleotidirakenteen tulee säilyä vahingoittumattomana synteesin ja puhdistuksen loppuun saakka. Nukleosideissa on 2–4 saman tyyppisesti reagoivaa hydroksyyli- ja amiiniryhmää. Spesifisillä menetelmillä osaan niistä liitetään suojaryhmä, jolloin oikea ryhmä saadaan altistettua muokkausreaktiolle, kuten esimerkiksi fosfaatin liittämiseksi. Hyvä suojaryhmä on helppo liittää nukleosidiin haluttuun kohtaan, on stabiili synteesiolosuhteissa, on helposti ja siististi poistettavissa miedoissa olosuhteissa, on symmetrinen sekä parantaa suojattavan molekyylin liukoisuutta.

Orgaanisen molekyylin hydroksyyli-ryhmä voidaan suojata asetaalina. Asetaali on happolabiili, ja asetaalina suojattu hydroksyyli voidaan vapauttaa miedoissa olosuhteissa kätevästi esimerkiksi happohydrolyysillä. Asetaalisuojauksen rakennetta muuttamalla voidaan vaikuttaa sen happostabiilisuuteen sekä suojatun molekyylin lipofiilisyyteen ja kiraalisuuteen. Asetaalisuojaus muodostetaan usein yksinkertaisessa happokatalysoidussa reaktiossa, jossa suojausreagenssi tuodaan vinyylieetterijohdokseksi.

Tässä tutkielman kirjallisuusosassa on otettu vuorollaan tarkasteluun nukleosidin eri hydroksyyli-ryhmien suojaaminen asetaalina oligonukleotidisynteesissä. On pyritty esittämään kunkin hydroksyyli-ryhmän rooli synteesissä, motiivi sen suojaamiselle ja asetaalisuojauksen toimivuus eri tapauksissa. Oligonukleotidi on herkkä hajoamaan tai muuntumaan etenkin happamissa olosuhteissa, joissa asetaalisuojaus usein poistetaan. Siksi eri asetaalirakenteiden happostabiilisuuteen kiinnitetään paljon huomiota. Joissakin tapauksissa asetaalisuojaus esitetäänkin muita suojaryhmiä miedommissa olosuhteissa poistettavana vaihtoehtona.

2 Nukleosidin 2'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina

RNA-syntetiikka on haastavaa, ja se onkin kehittynyt hitaammin kuin DNA-syntetiikka. RNA-synteesiä vaikeuttaa ribonukleiinihappojen 2'-hydroksyyli, jota ei ole deoksiribonukleiinihappoissa.¹ Oligonukleotidisynteesissä 2'-hydroksyyli tulee suojata kahdesta syystä. Suojaryhmä ohjaa fosfaatin kytkeytymään 3'-hydroksyyliin. Tämän lisäksi suojaryhmä estää fosfaatin 3'→2'-migraation synteesin myöhemmissä vaiheissa. 2'-hydroksyyli on nukleofiilinen ja siten altis hyökkäämään viereiseen 3'-*O*-fosfaattiin etenkin happamissa tai emäksisissä olosuhteissa. Tämä voi johtaa edelleen fosfaatin 3'→2'-migraatioon (kaavio 1).^{2,3} Oligonukleotideja joihin on muodostunut yksi tai useampi 2'→5'-sidos on mahdoton saada erilleen isomeerista, jossa on vain haluttuja 3'→5'-sidoksia.^{3,4} Suojaryhmän tulee olla stabiili synteesin eri vaiheissa, mutta sen tulee olla myös helposti poistettavissa sellaisissa olosuhteissa, että 3'→2'-migraatiota ei pääse tapahtumaan poistamisvaiheessakaan.⁴



Kaavio 1. Nukleotidin fosfaatin 3'→2'-migraatio.

2.1 Vaihtoehtoiset suojaryhmät 2'-hydroksyyllille

Eräs tapa suojata 2'-hydroksyyli on liittää siihen *tert*-butyylidimetyylisilyyliryhmä (TBS).⁵ Se sopii erinomaisesti käytettäväksi 5'-*O*-DMTr-suojaryhmän (dimetoksitrityyli) kanssa.¹ Oligonukleotidisynteesiä on tehty näiden suojaryhmien avulla menestyksekkäästi, ja se on saatu myös automatisoitua.^{1,6} Trityylijohdoksia on perinteisesti käytetty 5'-hydroksyylin suojaamiseen.^{1,7,8} Trityylien ominaisuuksia käsitellään enemmän luvussa "5'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina". Nukleosidin silyloiminen on nopea reaktio, mutta se ei ole selektiivinen 2'- ja 3'-hydroksyylien suhteen. Haluttu tuote saadaan kuitenkin erotettua silikakromatografian

avulla.¹ Silyylisuojarahmien yksi parhaista puolista onkin suoraviivaiset reaktioreitit. Silyyliryhmien hydrolysoitumista on tutkittu 80 %:ssa etikkahappoliuoksessa.¹ Mittaustuloksia on esitetty taulukossa 1. Nukleosidin 2'-*O*-TBS on niin happostabiili, että 5'-*O*-DMTr voidaan hydrolysoida selektiivisesti.¹ 2'-*O*-TBS on stabiili liitettäessä fosforyylikloridi 3'-hydroksyyliin kuivassa pyridiinissä ja hapetettaessa jodilla.¹ 2'-*O*-TBS on fluoridilabiili, ja se irtoaa tetrabutyyliammoniumfluoridilla tetrahydrofuraanissa 30 minuutissa.

Taulukko 1. TBDMS-suojaryhmän hydrolysoituminen uridiinista (U) ja adenosiinista (A).

	t (h)	A tai U	2'- <i>O</i> -TBS-(A tai U)	2',3'- <i>O</i> -TBS-(A tai U)
5'- <i>O</i> -TBS-U	24	40 %		
2',5'- <i>O</i> -TBS-U	21	6 %	82 %	
2',5'- <i>O</i> -TBS-A	20		70 %	
2',3',5'- <i>O</i> -TBS-U	28		~1 %	62 %
2'- <i>O</i> -TBS-U	22	100 %		

Vasemmassa sarakkeessa on lähtöaine. Oikealla on tuoteseoksen prosenttiosuudet reaktioajan (t) jälkeen. Hydrolyysiolosuhteina on 80 prosenttinen etikkahappo lämpötilassa 22 °C.

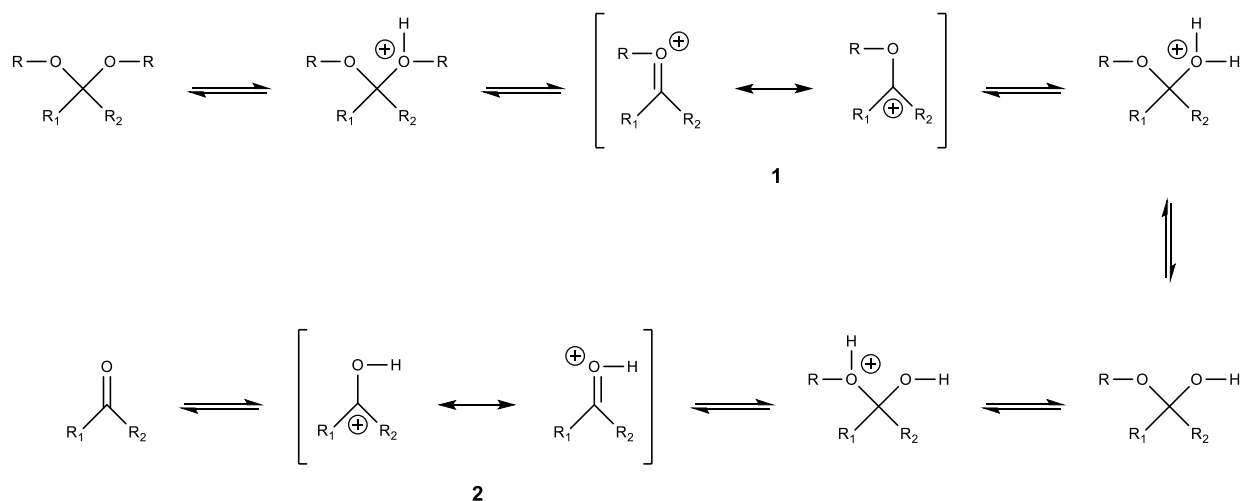
Nukleosidin 2'-hydroksyyli voidaan suojata myös asetaalina. Tämä estää fosfaatin 3'→2'-migraation.⁹ 2'-*O*-asetaaaleja voidaan käyttää yhdessä 5'-*O*-trityylisuojausten kanssa.^{10,11} Asetaalisuojaus voidaan lopuksi poistaa miedoissa olosuhteissa happohydrolyysillä tai muilla miedoilla menetelmillä. Asetaalisuojausten merkittävänä etuna voidaan pitää sitä, että sen poistoon ei käytetä fluoridisuoloja, jotka ilman erityistä puhdistusvaihetta saattavat jäädä tuotteen joukkoon.^{11,12} Lisäksi, kuten tässä luvussa tullaan osoittamaan, asetaalin happostabiilisuuteen, lipofiilisyyteen ja steerisiin ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa rakennetta muokkaamalla.

2.2 Oligonukleotidin happolabiilisuuden vaikutus suojaryhmän valintaan

Käytettäessä asetaalia 2'-hydroksyylin suojana, sen hydrolyysin tulee tapahtua niin miedoissa olosuhteissa, että fosfaatin migraatiota tai muita sivureaktioita ei pääse tapahtumaan. Happokatalyyttistä hydrolyysireaktiota on tutkittu optimaalisten reaktio-olosuhteiden selvittämiseksi. Samalla tieto oligonukleotidien herkkyydestä happamille olosuhteille on lisääntynyt. Optimaalisina 2'-*O*-asetaalin hydrolyysiolosuhteina pidettiin pitkään 0,01 M HCl-liuosta, kun taas 0,1 M HCl-liuoksen tiedettiin vahingoittavan oligonukleotidia. Uridilyyli-(3',5')-uridiinin fosfaatin 3'→2'-migraation oli raportoitu olevan 216 tunnissa (25 °C; 0,01 M HCl) alle 1 %.⁴ Vastaavasti 0,1 M HCl-liuoksessa 25 °C:ssa noin 6 % lähtöaineesta oli isomerisoitunut 50 tunnissa.⁴ Myöhemmin, kun on voitu käyttää tarkemmiksi kehittyneitä analyysimenetelmiä, suurempien oligonukleotidien on havaittu olevan oletettua herkempiä happamille olosuhteille.¹⁰ DMTr-(U'p)₉ tai ¹⁹U hajoaa tai isomerisoituu pH:ssa 2,0 (0,01 M HCl; 25 °C) lähes kokonaan 21 tunnissa.¹⁰ Nostettaessa pH 3,03:een (0,5 M trisasetaatti; 25 °C) hajoamista ei havaittu 24,5 tunnissa. Uridiinisekvenssit ovat herkempiä happamille olosuhteille, kuin luontaiset eri nukleotideja sisältävät sekvenssit. Sekvenssissä AUGAUCAUACA ei havaittu lainkaan hajoamista 26,5 tunnissa pH:ssa 2,42 ja lämpötilassa 25 °C toisessa, ja samoissa olosuhteissa sekvenssistä GGAUUAGUUCACCA vain 1 % oli hajonnut 29 tunnissa.¹⁰

2.3 Asetaalin happolabiilisuuteen vaikuttaminen

Asetaalin happolabiilisuus voidaan säätää sopivaksi alkyyli- ja alkoksiryhmiä muokkaamalla. Asetaalin happohydrolyysin yleisesti hyväksytty^{13,14} mekanismi on esitetty kaaviossa 1. Reaktion nopeutta rajoittava tekijä on oksokarbeniumionin **1** ja **2** muodostuminen.¹⁵ Asetaalin alkyyliryhmien ja keskushiileen jäävän alkoksiryhmän elektronegatiivisuuksien kasvattaminen hidastaa hydrolyysiä.¹⁶ Sen sijaan irtoavan alkoksiryhmän elektronegatiivisuudella ei ole vaikutusta hydrolyysinopeuteen.¹⁶ Elektroneja luovuttavien ryhmien voidaan ajatella stabiloivan oksokarbeniumionia,¹⁶ ja tämän siten helpottavan lähtevän alkoholin irtoamista. Mahdollisuus vaikuttaa suojaryhmän ominaisuuksiin rakennetta muuttamalla on yksi asetaaliryhmien parhaista ominaisuuksista.



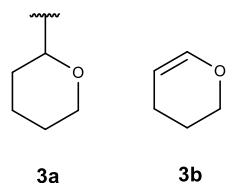
Kaavio 1. Asetaalin happohydrolyysin mekanismi.

2.4 Nukleosidin 2'-*O*-asetaalisuojaryhmät ja niiden kehittyminen

Useita rakennevaihtoehtoja on esitetty nukleosidin 2'-hydroksyylin suojaamiseen asetaalina. Uusia suojaryhmiä on kehitetty vastaamaan oligonukleotidisynteesin haasteisiin ja parantamaan tuotteen saantoa ja puhtautta. Tarkoituksena on ollut parantaa niiden stabiilisuutta käytettävissä synteesiolosuhteissa ja toisaalta tehdä niistä helpommin poistettavia synteesisarjan lopuksi.

2.5 Hydrolyysiominaisuuksien kehittyminen

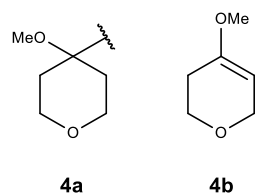
Tetrahydropyranyyliryhmän¹⁷ (THP) **3a** hydrolyysiominaisuuksia pidettiin pitkään optimaalisina.¹⁸ Uusia asetaalisuojaryhmiä kehitettiin siten, että saatiin jokin uusi tai paranneltu ominaisuus, mutta hydrolyysiominaisuudet pysyivät kuten THP:llä. 2'-*O*-THP-suojauksen hydrolysoitumista oli tutkittu useilla dinukleosidifosfaateilla ja havaittu, että hydrolysoituminen tapahtuu täydellisesti 0,01 M HCl-liuoksessa 20 °C:ssa kuudessa tunnissa.⁴ Sen hetkisen tiedon perusteella oligonukleotidin fosfaattiryhmien 3'→2'-migraatiota pidettiin kyseisissä olosuhteissa ja ajassa merkityksettömän pienenä.⁴



Kaavio 2. THP-suojaryhmä **3a** ja sitä vastaava suojausreagenssi **3b**.

Suojaryhmissä ei tulisi olla asymmetriakeskuksia, jos välituotteiksi halutaan puhtaita stereoisomeereja. THP-suojaryhmä ei täytä tätä vaatimusta. THP-suojattujen nukleosidistereoisomeerien erottaminen toisistaan on työlästä, ja puhtaan tuotteen saanto ei koskaan ole yli 50 %.¹⁹ Jos nukleosidista suojataan kaksi hydroksyyli ryhmää THP:llä, saadaan tuotteeksi neljä eri stereoisomeeria. Tällöin ei aina ole saatu kaikkia stereoisomeereja puhtaiksi lainkaan.¹⁹ Stereoisomeerien seoksista ajettut NMR-spektrit ovat monimutkaisia ja siksi vaikeita tulkita.

4-metoksitetrahydropyranyyli (MTHP) **4a** kehitettiin THP:n korvaajaksi, jossa ei ole asymmetriakeskusta.¹⁹ MTHP:llä on THP:n kaltaiset happohydrolysoitumisominaisuudet (taulukko 2). Kehitystyön lähtökohdaksi valikoitui 1-metoksi-sykloheksyyli. Sen hydrolyysinopeus on liian suuri mutta oikeansuuntainen. Esimerkiksi 2-metoksi-isopropyli (MIP) hydrolysoituu arviolta noin 2000 kertaa nopeammin¹⁹ ja formaldehydityyppiset asetaalit arviolta noin 1000 kertaa hitaammin^{19,20} kuin THP. 1-metoksi-sykloheksyylin happostabiilisuutta on lisätty muuttamalla alkyylirengasta elektronegatiivisemmaksi. Halutut hydrolyysiominaisuudet saavutettiin vaihtamalla yksi renkaan hiilistä hapeksi.¹⁹



Kaavio 2. MTHP-suojaryhmä **4a** ja sitä vastaava suojausreagenssi **4b**.

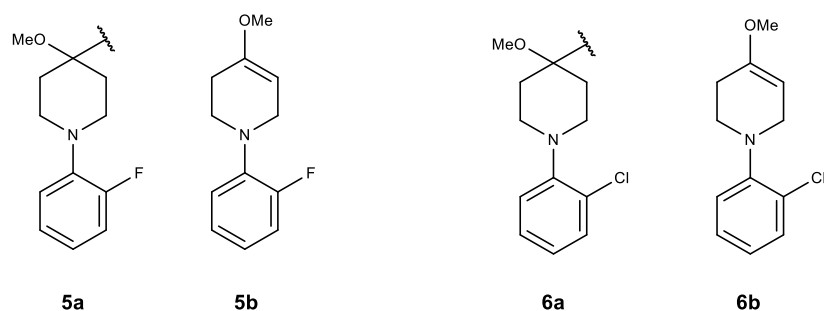
Taulukko 2. MTHP:n happohydrolysoitumisaikojen vertailu muihin asetaalisuojaryhmiin.

		T (°C)	t _{1/2} (min)	pH	
2'-O-THP-U	0,01 M HCl	22	67		Griffin <i>et al.</i> ⁴
2'-O-THP-A	0,01 M HCl	25	~60		Griffin <i>et al.</i> ⁴
2'-O-MTHP-U	0,01 M HCl	22	18,7	2	Norman <i>et al.</i> ²¹
2'-O-MTHP-A	0,01 M HCl	22	34	2	Norman <i>et al.</i> ²¹
2'-O-MIP-U	0,1 M NaCit.**	20	4,1	4	Reese <i>et al.</i> ¹⁹
2'-O-MCH-U*	0,1 M NaCit.**	20	10	4	Reese <i>et al.</i> ¹⁹

*MCH = metoksisykloheksyyli, ** NaCit. = natriumsitraatti

Nukleosidin 2'-O-asetalisuojauksen tulee kestää happolabiilin 5'-O-suojaryhmän poistaminen. Automatisoidussa oligonukleotidin kiintokantajasynteessissä edellisen nukleotidin 5'-hydroksyyli vapautetaan toistuvasti happokatalytisesti.^{8,10,11,22} Tämä altistaa 2'-O-suojaryhmän lukuisille happokäsittelyille. 2'-O-THP-suojauksen on havaittu irtoavan osittain poistettaessa 5'-O-piksyylä kolme prosentilla dikloorietikkahapolla 1,2-dikloorietaanissa,²³ vaikka asetaalin hydrolyysi noudattaakin spesifistä happokatalyyysiä.^{16,24} Havainnon voidaan olettaa koskevan samalla tavalla myös 2'-O-MTHP-asetalisuojauksen poistettaessa 5'-O-DMTr-ryhmää.¹²

1-(2-fluorifenyyli)-4-metoksipiperidi-4-nyyli (FPMP) **5a** ja 1-(2-kloori-4-metyylifenyyli)-4-metoksipiperidi-4-nyyli (CTMP) **6a** kestävät happolabiilin 5'-O-suojaryhmän poistamisen paremmin kuin THP tai MTHP.¹² FPMP:n ja CTMP:n aminoryhmä muodostaa matalassa pH:ssa konjugaattihapon. Sen induktiivinen vaikutus pitää asetaalin hydrolyysinopeuden lähes pH:sta riippumattomana pH-alueella 0,5–2,5 (taulukko 3). FPMP:n pK_a on 2 ja sen hydrolyysinopeus pH:ssa 2 on vastaava kuin THP:llä tai MTHP:llä.¹² Toisin kuin MTHP:n, FPMP:n happostabiilisuus ei laske pH:n laskiessa, ja siksi se kestää paremmin happolabiilin 5'-O-suojaryhmän poistamisen. FPMP on hieman happostabiilimpi kuin CTMP.¹² FPMP:n (pH 2,5–3) ja CTMP:n (pH 3–3,5) hydrolyysinopeudessa tapahtuu dramaattinen muutos, kun konjugoitunut amiini neutraloituu.¹²



Kaavio 3. Suojaryhmät FPMP **5a** ja CTMP **6a** sekä niitä vastaavat suojausreagenssit **5b** ja **6b**.

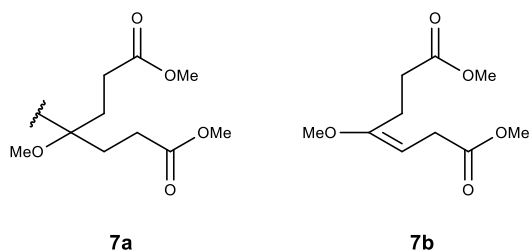
Taulukko 3. pH:n vaikutus CTMP:n ja FPMP:n happohydrolysoitumisaikoihin sekä vertailu vanhempiin asetaalisuojaryhmiin.

	$t_{1/2}$ (min)	pH		$t_{1/2}$ (min)	pH
2'-O-THP-U*	67	2,0	2'-O-MTHP-U**	18,7	2,0
2'-O-CTMP-U***	33,5	0,5	2'-O-FPMP-U***	41	0,5
2'-O-CTMP-U***	35,5	1,0	2'-O-FPMP-U***	44	1,0
2'-O-CTMP-U***	35	1,5	2'-O-FPMP-U***	50	1,5
2'-O-CTMP-U***	41	2,0	2'-O-FPMP-U***	52	2,0
2'-O-CTMP-U***	52	2,5	2'-O-FPMP-U***	70	2,5
2'-O-CTMP-U***	80	3,0	2'-O-FPMP-U***	166	3,0
2'-O-CTMP-U***	168	3,5	2'-O-FPMP-U***	334	3,5

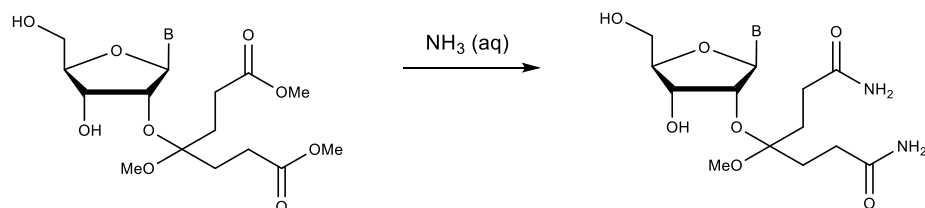
* Griffin *et al.*⁴ (22 °C), ** Norman *et al.*²¹ (22 °C), ***Reese *et al.*¹² (25 °C)

Uusi tieto oligoribonukleotidien happoherkkyydestä pakottaa käyttämään entistä miedompia hydrolyysiolosuhteita. 2'-*O*-MTHP-suojaryhmän poistamiseen käytettyjen olosuhteiden (0,01 M HCl; pH 2; huoneenlämpö; 6 h) on havaittu aiheuttavan fosfaatin 3'→2'-migraatiota ja oligonukleotidiketjun hajoamista.¹⁰ RNA-juoste on kuitenkin onnistuttu valmistamaan täysin vahingoittumattomana käyttämällä 2'-*O*-FPMP-suojaryhmää ja poistamalla se aiempaa miedommissa olosuhteissa (pH 3,0; 25 °C; 25,5 h).¹⁰ Jos CTMP kestää happolabiilin 5'-*O*-suojaryhmän poiston, se saattaisi olla vielä parempi 2'-*O*-suojaryhmä kuin FPMP. Taulukosta 3 havaitaan, että pH:ssa 3 CTMP on konjugaattihappona ja siten selvästi happolabiilimpi kuin FPMP.

Asetaalisuojaryhmä voidaan suunnitella myös sellaiseksi, että sen hydrolyysiominaisuudet muuttuvat ratkaisevasti oligonukleotidisynteesin päätteeksi tehtävässä ammoniakkikäsittelyssä. 3-metoksi-1,5-dikarbometoksipentanyylissä (MDMP)²⁵ **7a** asetaalin keskushiilen β-hiiliin on liittynyt elektroneja puoleensa vetävät esteriryhmät. Ne hidastavat suojaryhmän happohydrolyysiä. MDMP:n raportoidaan olevan stabiili olosuhteissa, joissa 5'-*O*-piksyili poistetaan.²⁵ Mitatut 2'-*O*-MDMP:n happohydrolysoitumisajat ovat kuitenkin samankaltaisia MTHP:n kanssa (taulukko 4). Käsittely ammoniakilla muuttaa esteriryhmät amideiksi (kaavio 5), mikä nopeuttaa asetaalisuojaryhmän hydrolyysinopeuden 17 kertaiseksi.²⁵ Ammoniakkikäsittelyä käytetään yleisesti oligonukleotidisynteesissä fosfaatti- tai emässuojauksen poistamiseen ja kiintokantajasta irrottamiseen.^{8,11}



Kaavio 4. MDMP-suojaryhmä **7a** ja sitä vastaava suojausreagenssi **7b**.



Kaavio 5. Nukleosidin 2'-*O*-MDMP-asetaalisuojauksen esteriryhmät muuttuvat NH₃-käsittelyssä amideiksi, mikä muuttaa asetaalin happolabiilimmaksi.

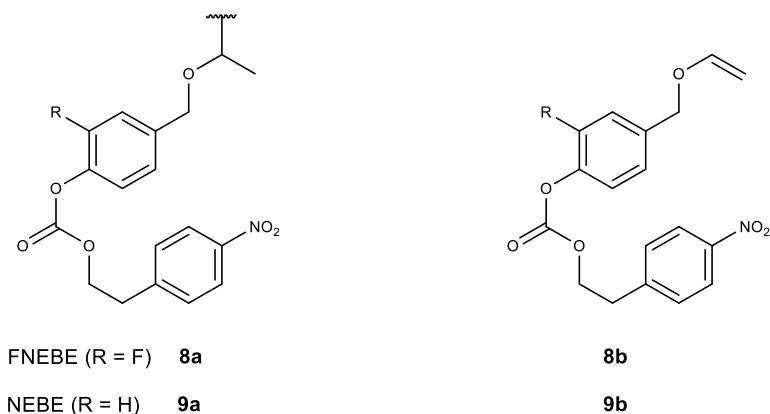
Taulukko 4. MDMP:n happohydrolysoitumisaikojen vertailu THP- ja MTHP-suojaryhmiin.

		T (°C)	t _{1/2} (min)	
2'- <i>O</i> -THP-U	80 % AcOH	20	69	Griffin <i>et al.</i> ⁴
2'- <i>O</i> -MDMP-U-Bz	80 % AcOH	HL	6	Sandström <i>et al.</i> ²⁵
2'- <i>O</i> -MDMP-A-Bz	80 % AcOH	HL	18	Sandström <i>et al.</i> ²⁵
2'- <i>O</i> -MTHP-U-Bz	80 % AcOH	HL	13	Sandström <i>et al.</i> ²⁵
2'- <i>O</i> -MTHP-A-Bz	80 % AcOH	HL	26	Sandström <i>et al.</i> ²⁵

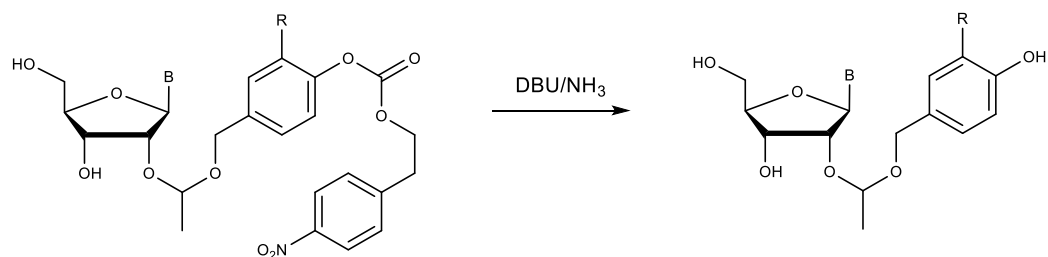
HL = huoneenlämpö

Myös 1-((3-fluori-4-(((2-(4-nitrofenyyli)etoksi)karbonyyli)oksi)bentsyyli)oksi)etyyliasetiili (FNEBE) **8a** ja 1-((4-(((2-(4-nitrofenyyli)etoksi)karbonyyli)oksi)bentsyyli)oksi)etyyliasetiili (NEBE) **9a** on suunniteltu muuttumaan oligonukleotidisynteesin aikana, ja ne voidaan lopuksi poistaa nopeasti erittäin miedoissa olosuhteissa.¹¹ Koska uridiinin 2'-*O*-asetiilisuojaus on happolabiilimpi, sen 2'-hydroksyylin suojaamiseen käytetään elektronegatiivisempaa FNEBE:ä ja muille nukleosideille NEBE:ä. FNEBE:n ja NEBE:n raportoidaan kestävän 5'-*O*-DMTr-suojauksen poiston kuivalla 1,3 %:lla DCA/DCM-liuoksella automatisoidussa oligonukleotidisynteesissä.¹¹ Yhdessä FNEBE:n ja NEBE:n kanssa emässuojaukseen on suunniteltu käytettävän 2-(4-nitrofenyyli)etyyliä (NPE) ja 2-(4-nitrofenyyli)etoksi)karbonyyliä (NPEOC).¹¹ Emässuojaukset ja fosfaatin syanoetoksi-suojaryhmä poistetaan DBU (1,8-diatsabisykloundek-7-eeni)/NH₃-käsittelyllä. Samalla 2'-*O*-suojaryhmästä irtoaa NPEOC-ryhmä ja suojaus muuttuu 1-((4-hydroksibentsyyli)oksi)etyyliksi (HBOE) (kaavio 7). Tämän jälkeen kiintokantajassa on kiinni oligonukleotidi, jossa ainoastaan 2'-hydroksyyli on suojattu

asetaaileina (HBOE). Irrottaminen kiintokantajasta tapahtuu ammoniakiliuoksella. Näin saatuja 2'-*O*-suojattuja oligonukleotideja voidaan säilyttää pakkasessa kuukausia, ja juuri ennen käyttöönottoa 2'-*O*-suojaus voidaan poistaa laimealla etikkahapolla (0,3–3 %; huoneenlämpö; 2 h).¹¹ FNEBE:n ja NEBE:n huono puoli on, että niissä on asymmetriakeskus, toisin kuin MDMP:ssä.



Kaavio 6. Suojaryhmät FNEBE **8a** ja NEBE **9a** sekä niitä vastaavat suojausreagenssit **8b** ja **9b**.



Kaavio 7. Nukleosidin 2'-*O*-FNEBE (R=F)- tai 2'-*O*-NEBE (R=H)-asetaalisuojaus hajoaa DBU/NH₃-käsittelyssä 2'-*O*-HBOE-asetaalisuojaukseksi, mikä muuttaa asetaalin happolabiilimmaksi.

2'-*O*-asetaalisuojaryhmän käytännön ominaisuudet saadaan varmistettua vasta riittävän suuren ja monipuolisen RNA-sekvenssin synteesissä. Yksittäisen nukleosidin 2'-*O*-asetaalisuojaryhmän happohydrolyysiominaisuuksista ei voida päätellä suojaryhmän käytettävyyttä

oligonukleotidisynteesissä. Taulukosta 5 havaitaan, että viereinen 3'-*O*-fosfaattiryhmä nopeuttaa 2'-*O*-asetaalien hydrolyysiä merkittävästi. Havaitaan myös, että uridiinin 2'-*O*-asetaalit ovat selvästi happolabiilimpia, kuin muiden nukleosidien 2'-*O*-asetaalit. Tästä syystä on perusteltua käyttää uridiinille happostabiilimpaa 2'-*O*-asetaalisuojaryhmää kuin muille nukleosidelle.¹¹ On myös havaittu, että oligonukleotidin koolla ja sen emäsekvenssillä on vaikutusta 2'-*O*-asetaalien hydrolyysinopeuteen.¹⁰

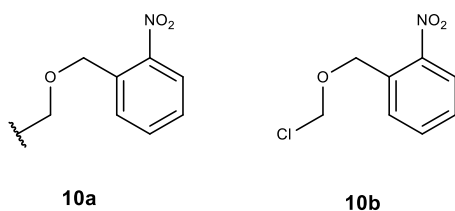
Taulukko 5. Eri nukleiinien ja 3'-*O*-fosfaatin vaikutus 2'-*O*-asetaalien happohydrolyysinopeuteen.

		°C	T _{1/2} (min)	pH	t _{0,99} (min)	
2'- <i>O</i> -CTMP-U		25	41	2,0		Reese <i>et al.</i> ¹²
2'- <i>O</i> -CTMP-UpU		25	21,5	2,0		Reese <i>et al.</i> ¹²
2'- <i>O</i> -FPMP-U		25	52	2,0		Reese <i>et al.</i> ¹²
2'- <i>O</i> -FPMP-UpU		25	23	2,0		Reese <i>et al.</i> ¹²
2'- <i>O</i> -MDMP-U-Bz	80 % AcOH	HL	6			Sandström <i>et al.</i> ²⁵
2'- <i>O</i> -MDMP-C-Bz	80 % AcOH	HL	4			Sandström <i>et al.</i> ²⁵
2'- <i>O</i> -MDMP-A-Bz	80 % AcOH	HL	18			Sandström <i>et al.</i> ²⁵
2'- <i>O</i> -MDMP-G-TBB	80 % AcOH	HL	15			Sandström <i>et al.</i> ²⁵
2'- <i>O</i> -MTHP-A	0,01 M HCl	22	34	2	226	Norman <i>et al.</i> ²¹
2'- <i>O</i> -MTHP-U	0,01 M HCl	22	18,7	2	124	Norman <i>et al.</i> ²¹
2'- <i>O</i> -MTHP-C	0,01 M HCl	22	40	2	266	Norman <i>et al.</i> ²¹
2'- <i>O</i> -MTHP-G	0,01 M HCl	22	35	2	233	Norman <i>et al.</i> ²¹
2'- <i>O</i> -MTHP-ApA	0,01 M HCl	22	19,9	2	132	Norman <i>et al.</i> ²¹
2'- <i>O</i> -MTHP-UpU	0,01 M HCl	22	6,1	2	41	Norman <i>et al.</i> ²¹

HL = huoneenlämpö

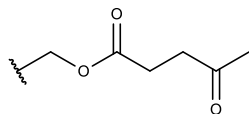
2.6 Muita keinoja poistaa 2'-*O*-asetaalisuojaus

Asetaalisuojarahmian poistaminen voi tapahtua myös valokemiallisesti. Nukleosidin 2'-hydroksyyli voidaan suojata ((2-nitrobentsyyli)oksi)metyylinä (NBM) **10a**.⁸ Sen raportoidaan kestävän 5'-*O*-DMTr-ryhmän poistaminen 3 %:lla monokloorietikkahapolla dikloorimetaanissa (1,2–2,5 min).⁸ Lopuksi 2'-*O*-NBM voidaan poistaa 5–9 tunnissa valokemiallisesti. Reaktioseos on vain lievästi hapan (pH = 3,9) ja valonlähteenä käytettävän elohopealampun säteily johdetaan pyrex-suodattimen läpi.⁸ NBM:llä on myös se hyvä puoli, että se ei steerisesti peitä viereistä 3'-*O*-fosforiamidiittia kasvavan nukleotidin 5'-hydroksyylin hyökkäykseltä.^{8,26} Tästä syystä 2'-*O*-NBM-suojatut nukleosidit saadaan liitettyä toisiinsa nopeammin, kuin esimerkiksi 2'-*O*-*orto*-nitrobentsyyლისuojatut nukleosidit.²⁶



Kaavio 8. NBM-suojaryhmä **10a** ja sitä vastaava suojareagenssi **10b**.

Asetaalisuojarahmian poistamiseen on käytetty myös hydratsiinia. Nukleosidin 2'-hydroksyyli voidaan suojata asetaalilevulinyyliesteriksi (ALE) **11**.²² Sitäkin on käytetty oligonukleotidisynteesissä yhdessä 5'-*O*-DMTr-suojauksen kanssa, ja senkin raportoidaan kestävän trityylin poistamisen (3 % TCA, 80 s).²² 2'-*O*-ALE-ryhmä voidaan poistaa 0,5 M:lla hydratsiiniliuoksella. Samalla irtoavat myös levuliini- ja dimetyyliformamidi-emässuojaukset.²²

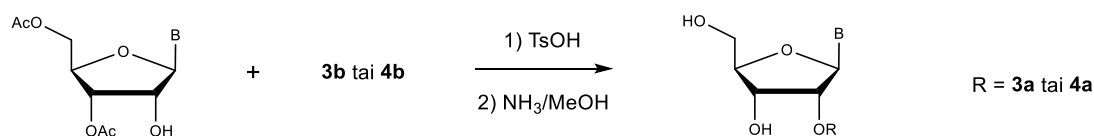


Kaavio 9. ALE-suojaryhmä **11**.

Moderneissa 2'-*O*-asetaalisuojaryhmissä yhdistyvät hyvä happostabiilisuus, hyvät steeriset ominaisuudet ja helppo poistettavuus miedoissa olosuhteissa. ALE, NBM, FNEBE, NEBE vaikuttavat rakenteensa perusteella selvästi elektronegatiivisemmilta kuin THP tai MTHP, ja niiden voidaan siksi olettaa myös kestävän happolabiilin 5'-*O*-suojaryhmän poiston paljon paremmin. Niissä ei myöskään ole steerisesti suuria ryhmiä lähellä asetaalin keskushiiltä, joten ne eivät peitä 3'-*O*-fosfaattia liittymästä nukleotidiketjuun. Lisäksi ne kaikki voidaan poistaa sellaisissa olosuhteissa, että se ei nopeuta fosfaatin 3'→2'-migraatiota.

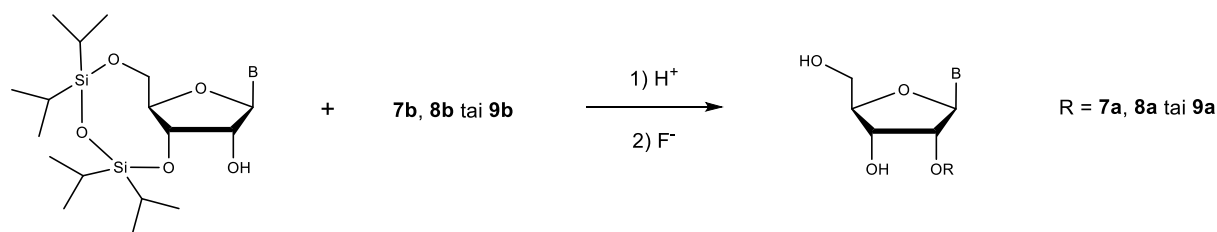
2.7 Selektiiviset menetelmät 2'-hydroksyyli ryhmän asetaalisuojaukseen

3',5'-*O*-diasetyloitu nukleosidi reagoi hapon katalysoimana vinyylieetterin kanssa, jolloin muodostuu 2'-*O*-asetali. Lopuksi asetyylisuojaus poistetaan ammoniakkin metanoliliuoksella (kaavio 10).^{4,18,19}



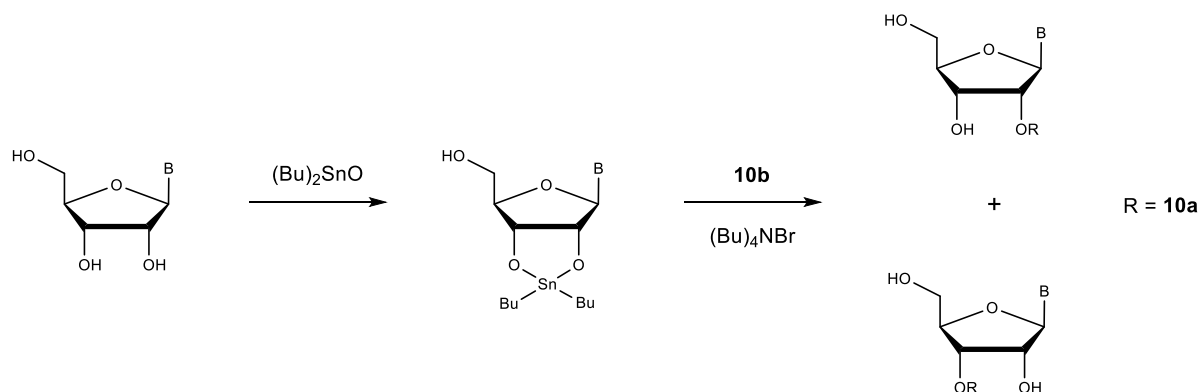
Kaavio 10. 3',5'-*O*-diasetyloidun nukleosidin 2'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina.

Nukleosidin 3'- ja 5'-hydroksyylit voidaan suojata ensin selektiivisesti silyyliryhmillä. Tämän jälkeen 2'-hydroksyylin annetaan reagoida hapon katalysoimana vinyylieetterin kanssa, jolloin muodostuu asetaali. Lopuksi silyyliryhmät poistetaan fluoridilla (kaavio 11).^{11,22,25}



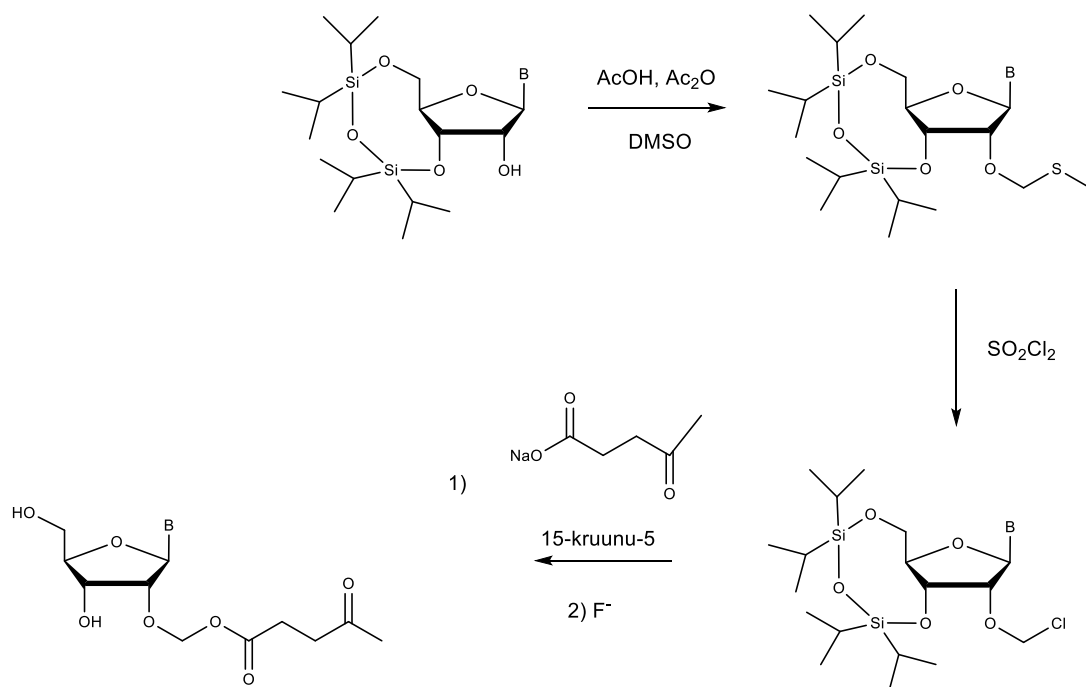
Kaavio 11. 3',5'-*O*-silyylisuojatun nukleosidin 2'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina.

Nukleosidin 2'- ja 3'-hydroksyyleihän voidaan liittää dibutyylitannyleeni. Tämän jälkeen sen annetaan reagoida *orto*-nitrobentsyylikloorimetyylieetterin **10b** kanssa tetrabutyyliammoniumkloridin tai -bromidin katalysoimana, jolloin muodostuu 2'-*O*- ja 3'-*O*-asetaalien seos. Isomeerit erotetaan toisistaan silikakromatografisesti (kaavio 12).^{8,26}



Kaavio 12. 2'- tai 3'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina stannyleenin avulla.

Myös ALE-suojaryhmä liitettiin 3',5'-silyloituun nukleosidiin. Asetaalisuojaus rakentui useampien välivaiheiden tuloksena. Ensin 2'-hydroksyyli muutettiin tiometyylieetteriksi reaktiolla etikkahapon, asetanhydridin ja dimetoksisulfoksidin kanssa. Välituotteen annettiin reagoida sulforyylikloridin kanssa ja saatiin 2'-*O*- CH_2Cl . Tämä reagoi natriumlevulinaatin kanssa muodostaen 2'-*O*-asetaalilevuliiniesterin. Lopuksi silyylisuojaus poistettiin fluoridilla (kaavio 13).²²



Kaavio 13. Nukleosidin 2'-hydroksyylin suojaaminen asetaalilevuliiniesteriksi.

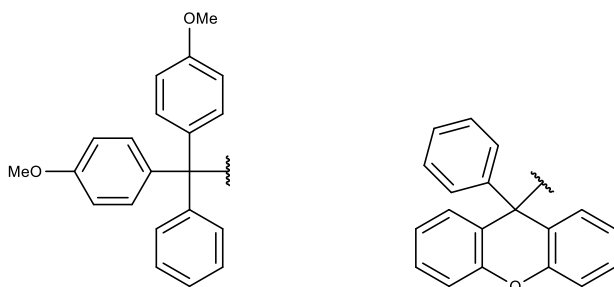
3 Nukleosidin 5'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina

Asetaaleja on käytetty oligonukleotidisyntetiikassa huomattavasti vähemmän 5'- kuin 2'-hydroksyylin suojaamiseen. Tämä johtuu trityylijohtosten ja esimerkiksi piksyylin vakiintuneesta ja menestyksekkästä käytöstä 5'-hydroksyylin suojaamisessa. On esitetty vain muutama oligonukleotidinsynteesin käytännön sovellus, jossa käytetään 5'-*O*-asetaalisojattuja nukleosideja. Lisäksi on raportoitu joitakin nukleosidin 5'-hydroksyylin suojaamiseen käytettyjä asetaaleja ja niiden happohydrolysoitumisominaisuuksia.

Nukleosidin primäärinen 5'-*O*-asetaalisojaus hydrolysoituu laimeassa hapossa nopeammin kuin vastaava sekundäärinen 2'-*O*-asetali. Esimerkiksi 5'-*O*-MTHP-uridiinin puoliintumisaika 0,01 M:ssa HCl-liuoksessa 20 °C:ssa on 10,5 minuuttia, kun samoissa olosuhteissa 2'-*O*-MTHP-uridiinin puoliintumisaika on 24 minuuttia.¹⁹

3.1 Trityylijohdokset 5'-hydroksyylin suojaamisessa

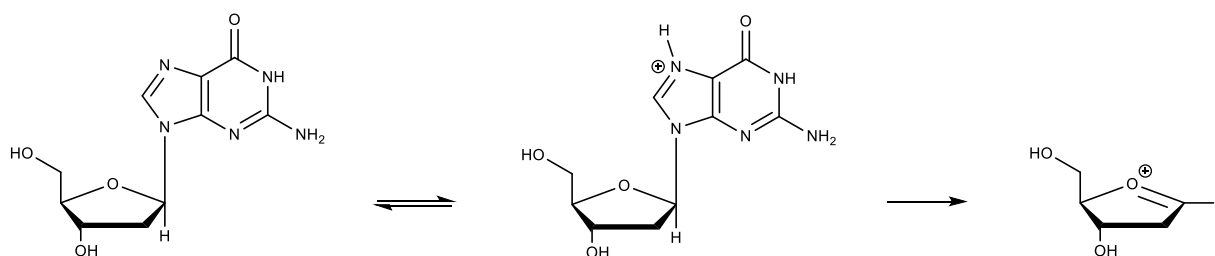
Trityylin metoksijohdokset ja etenkin 4,4'-dimetoksitrityyli (DMTr) (kaavio 14) ovat yleisesti käytettyjä suojaryhmiä 5'-hydroksyylin suojaamiseen oligonukleotidisyntetiikassa. Trityyliin kiinnittyneiden metoksiryhmien määrä vaikuttaa suojaryhmän happostabiilisuuteen. Trityyli on liian stabiili, kun taas trimetoksitrityyli on liian epästabiili nukleosidin 5'-hydroksyylin suojaryhmäksi.²⁷ Tritylointi vähentää nukleosidin tai nukleotidin polaarisuutta, mikä parantaa liukoisuutta orgaanisiin liuottimiin. Synteesin lopussa viimeisen nukleotidin lipofiilinen trityyli jätetäänkin usein paikoilleen helpottamaan oligonukleotidin kromatografista puhdistusta.^{8,28} Orgaanisissa liuottimissa trityylin irtoamista voidaan seurata kvantitatiivisesti mittaamalla trityylikationin absorbanssia.^{29,30}



Kaavio 14. Vasemmalla DMTr- ja oikealla piksyli-suojaryhmä.

Trityylin poistaminen happojen avulla aiheuttaa depurinaatiota (kaavio 15).³⁰⁻³² Poistamiseen käytetyt olosuhteet tulee olla optimaaliset, jotta depurinaatio saadaan minimoitua. Trityylin irtoaminen on huomattavasti nopeampi reaktio kuin depurinaatio,³⁰ ja siksi reaktio pyritään tekemään nopeasti.²⁹ Trityylin poistaminen nopeasti ja täydellisesti orgaanisissa liuottimissa vaatii vahvojen proottisten happojen käyttöä.²⁹ Triklooretikkahappoa (TCA) ($pK_a = 0,7$) ja dikloorietikkahappoa (DCA) ($pK_a = 1,5$) on perinteisesti käytetty trityylin nopeaan irrottamiseen.^{31,32} TCA:n on todettu kuitenkin olevan liian vahva happo ja aiheuttavan enemmän depurinaatiota kuin DCA.³⁰ Siksi DCA:n (3 %, 3 min)³³ tai monokloorietikkahapon (3 %; 1,2-2,5 min)⁸ käyttö on nykyään yleisempää.³² DCA- ja TCA-molekyyleillä on affiniteetti kiinnittyä oligonukleotidiin, ja siten deaktivoitua detrityloimisessa.³⁴ Oligonukleotidin koon ja

konsentraation kasvaessa siihen kiinnittyneiden happomolekyylien määrä kasvaa samassa suhteessa.³⁰ On havaittu, että happokonsentraatiota nostamalla voidaan joskus saavuttaa nopea ja tehokas detrityloituminen pienemmällä depurinaatiolla.³⁰ Viimeinen trityylisuojaus poistetaan usein vasta puhdistuksen ja emässuojausten poistamisen jälkeen vesiliuoksessa.²⁸ Erityisesti tässä vaiheessa reaktio-olosuhteet kuten pH, aika, lämpötila, suolapitoisuus ja mahdollinen apuliuottimen määrä tulee optimoida.²⁸

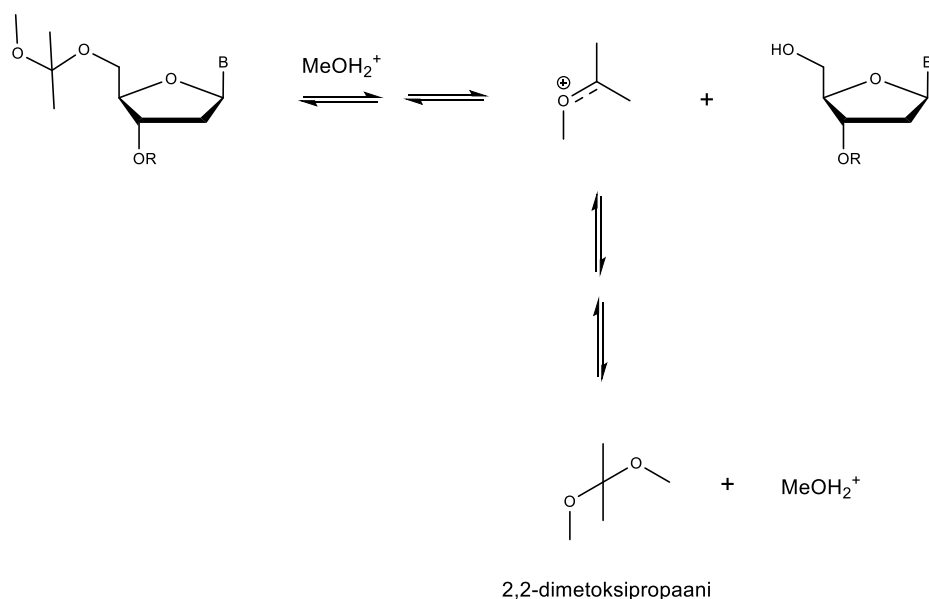


Kaavio 15. Guanosinin depurinaatio.³⁵

Trityylisuojausten poistaminen on tasapainoreaktio,²⁹ joten trityyliikationiylimäärä estää reaktiota menemästä loppuun. Trityyliä ei saada helposti uutettua tai muuten erotettua reaktioseoksesta.³⁶ Ilman huuhtelua tai muuta puhdistusta tehtävässä synteesissä muodostuu trityyliikationin kertyminen reaktioseokseen ongelmaksi. Tällöin saadaan valmistettua vain muutaman nukleotidin mittaisia ketjuja.³⁶ Kiintokantajasynteesissä tätä ongelmaa ei ole, koska irrotetut trityylit voidaan huuhdella pois, jolloin uusi suojaryhmän poistoreaktio tehdään puhtaassa liuotuksessa.

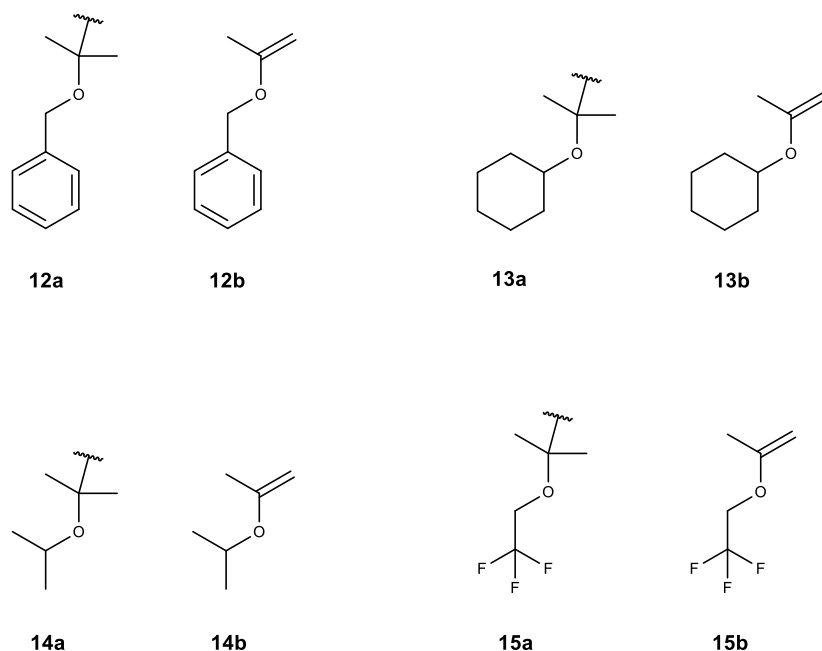
3.2 Asetaalisuojaryhmien käyttötavat 5'-hydroksyylin suojaamisessa

2-metoksi-isopropyylä (MIP) voidaan käyttää 5'-hydroksyylin suojaamiseen.³⁶ Sen hyvä puoli on, että sen happokatalysoidussa metanolyysissä muodostuu haihtuvaa 2,2-dimetoksipropania (kaavio 16), ja myös metanolijäämät ovat helposti poistettavissa. Siten se sopii trityyliä paremmin liuoksessa tapahtuvaan synteesiin.³⁶ MIP on pienikokoinen suojaryhmä. Siksi se ei lisää nukleosidin lipofiilisyyttä kuten trityylijohdokset.³⁷



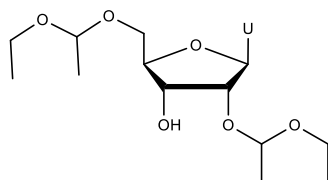
Kaavio 16. MIP-suojauksen happokatalyyttinen metanolyysi³⁸. 2,2-dimetoksipropani voidaan haihduttaa pois reaktioseoksesta, jolloin suojaryhmän poistoreaktiosta tulee irreversiibeli.³⁶

Asetonityyppisten asetaalisuojaryhmien, kuten MIP, happohydrolysoitumisominaisuuksiin ja lipofiilisyyteen voidaan vaikuttaa alkoksiryhmän valinnalla. 2-metoksi-isopropyli (MIP)³⁷ ja 2-bentsyylioksi-isopropyli³⁷ **12a** ovat vesiliuoksessa vain hieman happolabiilimpia kuin DMTr²⁸. Alkyliryhmät ovat elektroneja luovuttavia ryhmiä ja siten lisäävät asetaalin happolabiilisuutta. 2-sykloheksyylioksi- **13a** tai 2-isopropyyloksiryhmä **14a**, tekee asetonityyppisestä asetaalisuojaryhmästä huomattavasti happolabiilimman kuin DMTr.³⁷ Toisaalta, jos rakenteeseen lisätään elektroneja puoleensa vetäviä ryhmiä kuten fluoriatomeja, stabiloivat nämä asetaalia happohydrolyysiä kohden. Esimerkiksi 2-(2',2',2'-trifluorietyylioksi)isopropyli **15a** on hyvin happostabiili suojaryhmä.³⁷ Suuri alkyliryhmä lisää suojaryhmän lipofiilisyyttä. Asetaalin happostabiilisuus on hyvä säätää sopivaksi juuri fluoriatomeilla, koska myös vetyjen korvaaminen fluorilla lisää hiilivedyn lipofiilisyyttä³⁹.

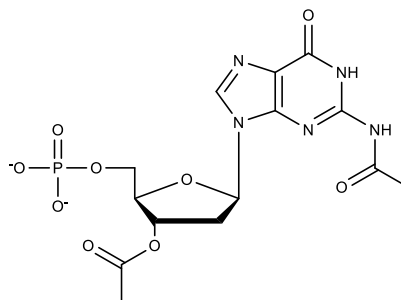


Kaavio 17. Asetaalisuojaryhmiä (a) ja niitä vastaavat suojausreagenssit (b). 2-bentsyylioksi-isopropyyli **12a**, 2-sykloheksyylioksi-isopropyyli **13a**, 2-isopropyloksi-isopropyyli **14a** ja 2-(2',2',2'-trifluorietyylioksi)isopropyyli **15a**.

5'-hydroksyylin suojaamista asetaalina on käytetty, kun oligonukleotidin valmistus on aloitettu 5'-terminaalisesta nukleosidista. Tässä synteositavassa nukleotidiketjun vapaaseen 3'-hydroksyylin **16** liitetään 5'-*O*-fosforyloitu nukleosidi **17**. 1-etoksiet-1-yyli on liitetty suojaamaan terminaalisien nukleosidien 2'- ja 5'-hydroksyyliä.⁴⁰ Lopuksi asetaalisuojaukset on poistettu 20 %:lla etikkahapolla 50 °C:ssa.



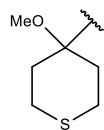
16



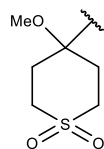
17

Kaavio 18. 2'-*O*- ja 5'-*O*-asetaalisuojattuun uridiiniin **16** voidaan liittää 5'-*O*-fosforyloitu 3'-*O*- ja *N*²-asetyylisuojattu guanosiini **17**.

Rikkiä sisältävän aetaalisuojaryhmän happostabiilisuutta voidaan lisätä huomattavasti hapettamalla. Nukleosidin 5'-hydroksyyli voidaan suojata 4-metoksitetrahydrotiopyraanyyliksi **18**.⁴¹ Se on hieman happolabiilimpi suojaryhmä kuin THP. 4-metoksitetrahydrotiopyraanyyli voidaan kuitenkin hapettaa *m*-klooriperbentsoehapolla 4-metoksitetrahydrotiopyraanidioksidiyyliksi **19**. Tällöin suojaryhmä muuttuu huomattavasti elektronegatiivisemmaksi, ja sen happostabiilisuus kasvaa 2000 kertaa suuremmaksi kuin THP:n.⁴¹ Seuraa väistämättä kysymys: onko suojaryhmä mahdollista pelkistää takaisin happolabiilimpaan muotoon **18**, ja voiko suojaryhmän hapettamis-pelkistämistä käyttää näin sen suojaamiseen?



18

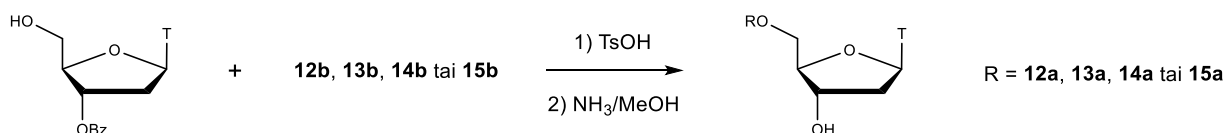


19

Kaavio 19. Asetaalisuojaryhmät 4-metoksitetrahydrotiopyraanyyli **18** ja 4-metoksitetrahydrotiopyraanidioksidiyyli **19**.

3.3 Selektiiviset menetelmät 5'-hydroksyyliyhmän asetaalisuojaukseen

5'-hydroksyylin suojaamista asetaalina on käytetty nukleosidikemiassa hyvin vähän, joten vaihtoehtoisia suojausstrategioitakaan ei ole helppo löytää. Eräs tapa on käyttää 3'-*O*-bentsoyloitua tymidiiniä. Sen annetaan reagoida hapon katalysoimana vinyylieetterin kanssa, jolloin muodostuu 5'-*O*-asetaaali. Lopuksi bentsoyylisuojaus poistetaan ammoniakin metanoliliuoksella (kaavio 20).³⁷

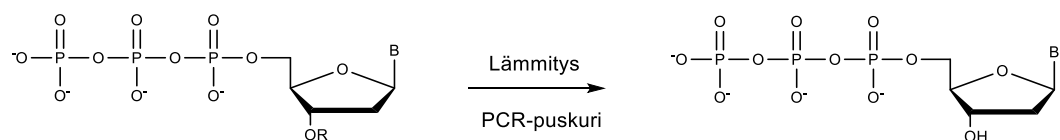


Kaavio 20. 3'-*O*-bentsoyloidun tymidiinin 5'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina.

4 Nukleosidin 3'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina

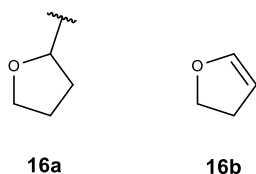
4.1 3'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina PCR-menetelmässä

3'-*O*-asetaaalisuojattuja nukleosideja käytetään esimerkiksi valmistettaessa DNA:ta PCR-tekniikalla (polymeraasiketjureaktio). Siinä DNA-juoste monistetaan entsymaattisesti moninkertaiseksi ja lähtöaineena käytetään dNTP-molekyylejä (deoksinukleosiditrifosfaatti).⁴² Synteesiä katalysoiva entsyymi ei voi käyttää 3'-*O*-suojattuja dNTP-molekyylejä, joten suojaus estää sattumanvaraiset liittymisreaktiot synteesin valmisteluvaiheessa.⁴³ PCR-synteesissä DNA-vastinjuosteet denaturoidaan lämpötilaa nostamalla jokaisen synteesisyklin alussa.⁴² Tällöin myös 3'-*O*-suojaus irtoaa (kaavio 21) ja dNTP-molekyyliejä vapautuu käytettäviksi synteesin lähtöaineina.⁴³ 3'-*O*-suojauksen labiilisuus tulee olla optimaalinen, jotta sopiva määrä lähtöainetta vapautuu jokaisessa syklissä.⁴³



Kaavio 21. 3'-*O*-asetalisuojaus voidaan irrottaa dNTP-molekyylistä lämpötilaa nostamalla.

Asetaalin hydrolyysiominaisuudet sopivat hyvin PCR-tekniikassa käytettävälle nukleodisin 3'-hydroksyylin suojaryhmälle. PCR-puskuriliuos sisältää tyypillisesti tris-HCl:a, ja liuos on heikosti emäksinen huoneen lämmössä, jolloin asetaali on stabiili.⁴³ Lämpötilaa nostettaessa PCR-puskuriliuoksen pH laskee lievästi happamaksi, jolloin asetaalin labiilisuus kasvaa. dTTP:n (tymidiinitrifosfaatti) 3'-*O*-asetaalien lämpökatalysoituja hydrolysoitumisaikoja on mitattu PCR-liuoksessa (10 mM tris-HCl, 95 °C).⁴³ Puoliintumisajoiksi saatiin 80 min (tetrahydrofuranyyli THF **16a**), 100 min (MTHP) ja 250 min (THP). 25 °C:ssa puskuriliuoksen pH oli 8,4, mutta lämpötilan noustessa 95 °C:seen pH laski noin 2 yksikköä. Tutkituista asetaalisuojaryhmistä THF:n hydrolyysinopeus sopi parhaiten PCR-synteesiin.⁴³ THF:n huono puoli on, että se tuo mukanaan asymmetrisen hiilen suojattavaan yhdisteeseen.



Kaavio 22. THF-suojaryhmä **16a** ja sitä vastaava suojausreagenssi **16b**.

3'-*O*-asetaalisuojatut nukleosidit ovat selvästi happolabiilimpia kuin 2'-*O*-asetaalisuojatut. 3'-*O*-asetaalisuojattujen nukleosidien hydrolysoitumisnopeuksia on raportoitu vain vähän. 3'-*O*-MTHP:n on havaittu hydrolysoituvan huomattavasti nopeammin kuin 2'-*O*-MTHP:n (taulukko 6).²¹ Ei kuitenkaan voida päätellä, että 3'-*O*-asetaalisuojattujen nukleosidien ja dNTP-molekyylien hydrolyysiajat olisivat samanlaisia. Olemassa olevaa aineistoa voidaan kuitenkin käyttää suuntaa-antavasti vertailtaessa asetaalisuojaryhmien happolabiilisuuksia keskenään. Koska THF on vain hieman labiilimpi PCR-menetelmässä kuin MTHP ja koska MDMP on happolabiilimpi kuin MTHP (taulukko 4), voisi MDMP tarvittaessa olla vaihtoehto labiilimmaksi suojaryhmäksi PCR-menetelmään.

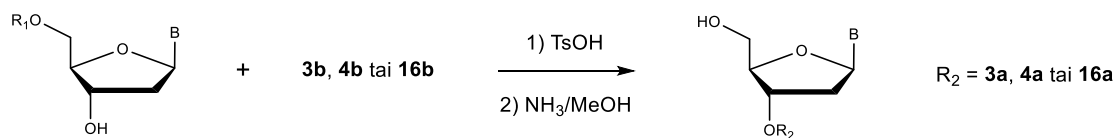
Taulukko 6. Nukleosidin 2'- ja 3'-*O*-MTHP-suojauksen hydrolyysiaikojen vertailua.²¹

	t _{1/2} (min)	t _{0,99} (min)
2'- <i>O</i> -MTHP-A	34	226
2'- <i>O</i> -MTHP-U	18,7	124
2'- <i>O</i> -MTHP-A-(3',5')-A	19,9	132
2'- <i>O</i> -MTHP-U-(3',5')-U	6,1	41
3'- <i>O</i> -MTHP-A	7,4	49
3'- <i>O</i> -MTHP-U	6,3	44
3'- <i>O</i> -MTHP-A-(2',5')-A	3,7	25
3'- <i>O</i> -MTHP-U-(2',5')-U	1,7	11

Hydrolyysiolosuhteet: 0,01 M HCl, pH 2, 22 °C.

4.2 Selektiiviset menetelmät 3'-hydroksyyli ryhmän asetaalisuojaukseen

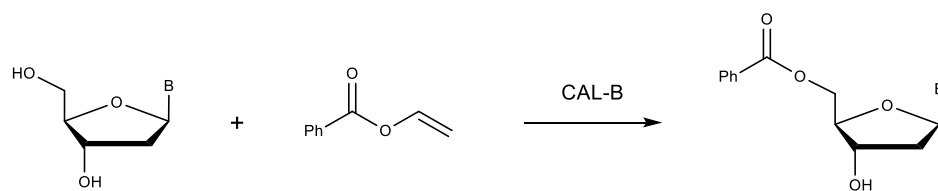
3'-*O*-asetaalisuojattuja 2'-deoksinukleosideja on valmistettu 5'-*O*-esterisuojatun välituotteen kautta (kaavio 23). 5'-*O*-esterisuoja 2'-deoksinukleosidi reagoi *para*-tolueenisulfonihapon katalysoimana vinyylieetterin kanssa, jolloin muodostuu 3'-*O*-asetali. Esterisuojaryhmänä on käytetty levuliiniä, asetyyliä ja bentsoyyliä. Lopuksi esterisuojaus poistetaan ammoniakki metanoliliuoksella.^{43,44}



R_1 = levulinyyli, asetyyli tai bentsoyyli

Kaavio 23. 5'-*O*-esterisuojatun 2'-deoksinukleosidin 3'-hydroksyylin suojaaminen asetaalina.

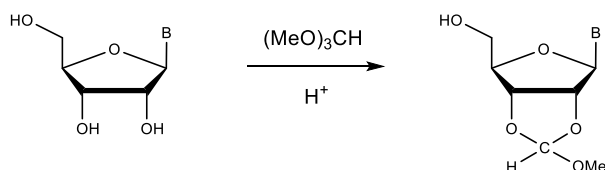
2'-deoksinukleosidin 5'-hydroksyyli voidaan bentsyoloida selektiivisesti entsyymien avulla. Tällöin suojausreagenssina voidaan käyttää vinylibentsoaattia ja katalyyttinä *Candida antarctica* B:tä (CAL-B) (kaavio 24). Selektiivisyys on erinomainen, sillä saantojen raportoidaan olevan kaikille 2'-deoksinukleosideille noin 90 %.⁴⁴



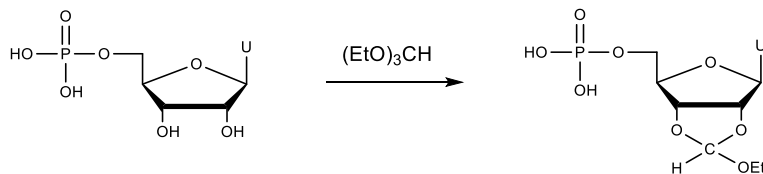
Kaavio 24. 2'-deoksinukleosidin 5'-hydroksyylin selektiivinen bentsyloiminen entsyymaattisesti.

5 Nukleosidin 2'- ja 3'-hydroksyylien suojaaminen syklisenä asetaalina

Liuoksessa tapahtuvaa oligonukleotidisynteesiä varten RNA:n 3'-terminaalisen nukleosidin 2'- ja 3'-hydroksyydit voidaan suojata syklisenä asetaalina (kaaviot 25 ja 26). 2',3'-metoksimetyylisuojaus voidaan liittää suoraan suojaamattomaan nukleosiidiin (kaavio 25). Reaktio tapahtuu trimetyyliortoformaatissa hapon katalysoimana liuottimen toimiessa samalla myös suojausreagenssina. Myös 5'-hydroksyyli voi reagoida suojausreagenssin kanssa, mutta puhdistuksen jälkeen 2',3'-*O*-metoksimetyyliidiinukleosidien saannot ovat olleet vähintään noin 80 %.⁴⁵ Syklinen 2',3'-*O*-asetaalisuojaus voidaan liittää myös 5'-*O*-fosfaatinukleosiidiin, jolloin hapan 5'-*O*-fosfaatti toimii katalyyttinä. Tällä tavoin on valmistettu 5'-*O*-fosfaatti-2',3'-*O*-etoksimetyyliidiiniuridiinia (kaavio 26).⁴⁰



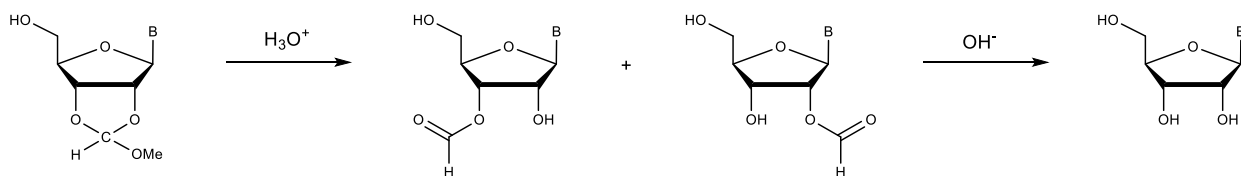
Kaavio 25. Nukleosidi reagoi hapon katalysoimana trimetyyliortoformaatin kanssa ja muodostuu 2',3'-*O*-metoksimetyyliidiinukleosidi.



Kaavio 26. Uridiini-5'-*O*-fosfaatti reagoi itsenä katalysoimana trietyyliortoformaatin kanssa ja muodostuu 5'-*O*-fosfaatti-2',3'-*O*-etoksimetyyliidiiniuridiini.

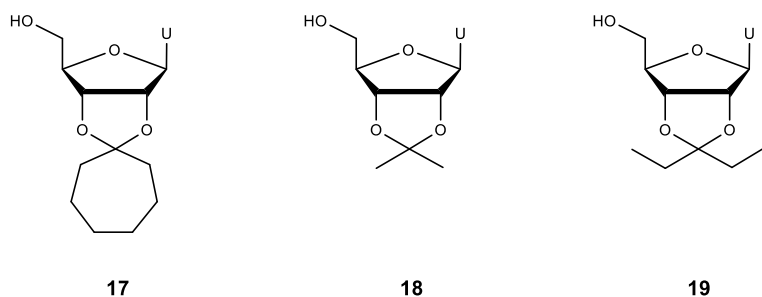
Liouksessa tapahtuvassa oligonukleotidisynteesissä yhdessä terminaalisen nukleosidin 2',3'-*O*-asetalisuojauksen kanssa muiden nukleosidien 2'-hydroksyylin suojaamiseen käytetään usein jotain happolabiilia suojaryhmää.^{3,40,45} 2',3'-*O*-suojauksen tulee olla yhtä happolabiili tai hieman labiilimpi kuin 2'-*O*-suojaryhmän, jotta molemmat suojaryhmät irtoaisivat lopuksi nopeasti ja samanaikaisesti.^{3,45} 2',3'-*O*-metoksimetyliidiinisuojaattujen nukleosidien puoliintumisajat pH:ssa 2 (0,01 M HCl) ja 20 °C:een lämpötilassa ovat 10,5–36 minuuttia,⁴⁵ joten 2',3'-*O*-metoksimetyliidiinisuojaus sopii käytettäväksi 2'-*O*-THP-suojauksen kanssa (taulukko 2). 2',3'-*O*-metoksimetyliidiinisuojaatun nukleosidin 5'-hydroksyyliin voidaan liittää fosfaatti, ja siihen edelleen 2'-*O*-THP-5'-*O*-pivaloyylinukleosidi.⁴⁵ 2',3'-*O*-metoksimetyliidiini- ja 2'-*O*-THP-suojaukset voidaan poistaa 0,01 molaarisessa HCl-liouksessa 20 °C:ssa kuudessa tunnissa.⁴ Oligonukleotidisynteesiin on käytetty myös 2',3'-*O*-etoksimetyliidiinisuojaattua nukleosidia yhdessä 2',5'-di-*O*-(1-etoksietyyli)suojaatun nukleosidin kanssa. Tällöin asetaalisuojaukset saatiin lopuksi poistettua 20 prosenttisessa etikkahappoliouksessa 50 °C:ssa puolessa tunnissa.⁴⁰

Nukleosidin 2',3'-*O*-metoksimetyliidiinisuojaus hydrolysoituu kaksivaiheisesti (kaavio 27). Ensin happohydrolyysissä muodostuu hyvin emäslabiili 2'-*O*- tai 3'-*O*-formyyli. Nämä hydrolysoituvat edelleen neutraaleissa tai emäksisissä olosuhteissa. 2'-*O*- ja 3'-*O*-formyyliseoksen puoliintumisaika 20 °C:ssa pH:ssa seitsemän on kolme tuntia ja pH:ssa yhdeksän vain kymmenen minuuttia.⁴⁵



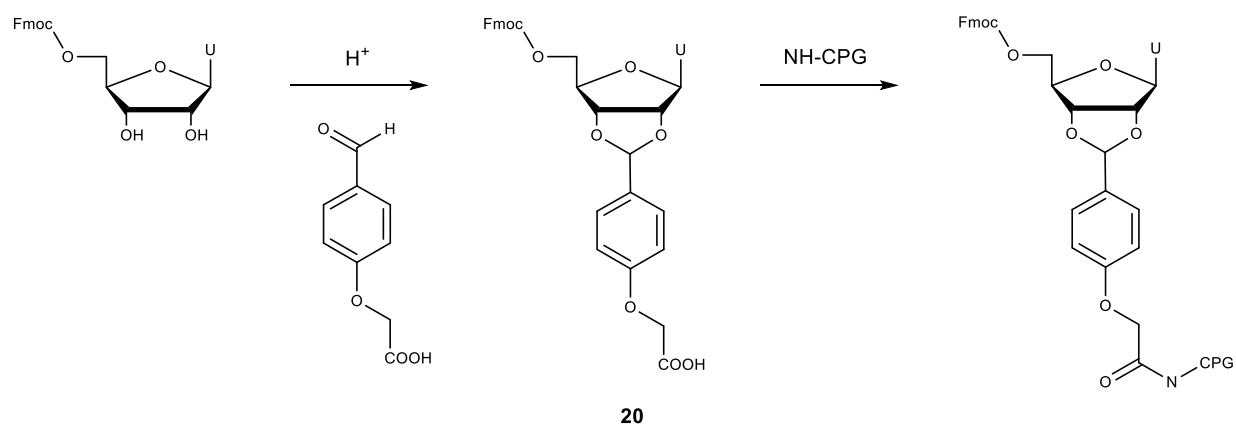
Kaavio 27. Nukleosidin 2',3'-*O*-metoksimetyliidiinisuojaus hydrolysoituu kaksivaiheisesti.

Nukleosidin 2'- ja 3'-hydroksyylien suojaamiseen on käytetty myös syklisiä ketaaleja. Niiden tehtävänä on ollut sitoa 2'- ja 3'-hydroksyyliä ja näin selektiivisesti altistaa 5'-hydroksyyli muokkaamisreaktioille.⁴⁶ 2',3'-*O*-ketaalit ovat liian happostabiileja käytettäväksi oligonukleotidisynteesissä. Esimerkiksi 26 °C:ssa pH:ssa 2 uridiinin 2',3'-*O*-sykloheptylidiinisuojausten **17** puoliintumisaika on kolme tuntia, 2',3'-*O*-isopropylidiinin **18** puoliintumisaika on 20 tuntia ja 2',3'-*O*-dietyylimetyylidiinin **19** puoliintumisaika on 40 tuntia.⁴⁶



Kaavio 28. Syklisenä 2',3'-*O*-ketaalina suojattuja uridiinimolekyyliä. 2',3'-*O*-sykloheptylidiiniuridiini **17**, 2',3'-*O*-isopropylidiiniuridiini **18**, ja 2',3'-*O*-dietyylimetyylidiiniuridiini **19**.

Syklistä 2',3'-*O*-asetaalirakennetta on käytetty myös terminaalisen nukleosidin kiinnittämisessä kiintokantajaan. Ensin 5'-*O*-Fmoc-uridiini reagoi hapon katalysoimana 4-formyylifenoksietikkahapon kanssa. Muodostuneen 5'-*O*-Fmoc-2',3'-*O*-*para*-fenoksietikkahappometyylidiiniuridiinin **20** karboksyylihapporyhmä reagoi LCAA-CPG-kiintokantajan (long-chain alkylamino controlled pore glass) aminoryhmän kanssa, ja muodostuu amidisidos (kaavio 29). Yhdessä kyseisen kiintokantajakiinnityksen kanssa nukleosidien 5'-hydroksyylin suojaamiseen on käytetty emäslabiilia 9-fluorenyylimetoksykarbonyyliä (Fmoc) ja 2'-hydroksyylin suojaamiseen MTHP:tä.⁴⁷ Fmoc:ä on käytetty trityyli- tai piksyylisuojausten sijaan, koska sen poistaminen emäksellä ei vaikuta 2'-*O*-MTHP-suojauksiin.^{23,47} 2',3'-*O*-asetaalirakenteista kiintokantajakiinnitystä on puolestaan käytetty, koska sekin kestää Fmoc:n poistamisen. 5'-*O*-Fmoc-suojauksen poistamiseen on käytetty piperidiiniä, ja asetaalisuojaukset on lopuksi poistettu HCl-liuoksella pH:ssa 2.⁴⁷



Kaavio 29. 5'-*O*-Fmoc-2',3'-*O*-*para*-fenoksietikkahappometyyliidiiniuridiini **20** voidaan kiinnittää kiintokantajaan amidisidoksella.

KOKEELLINEN OSA

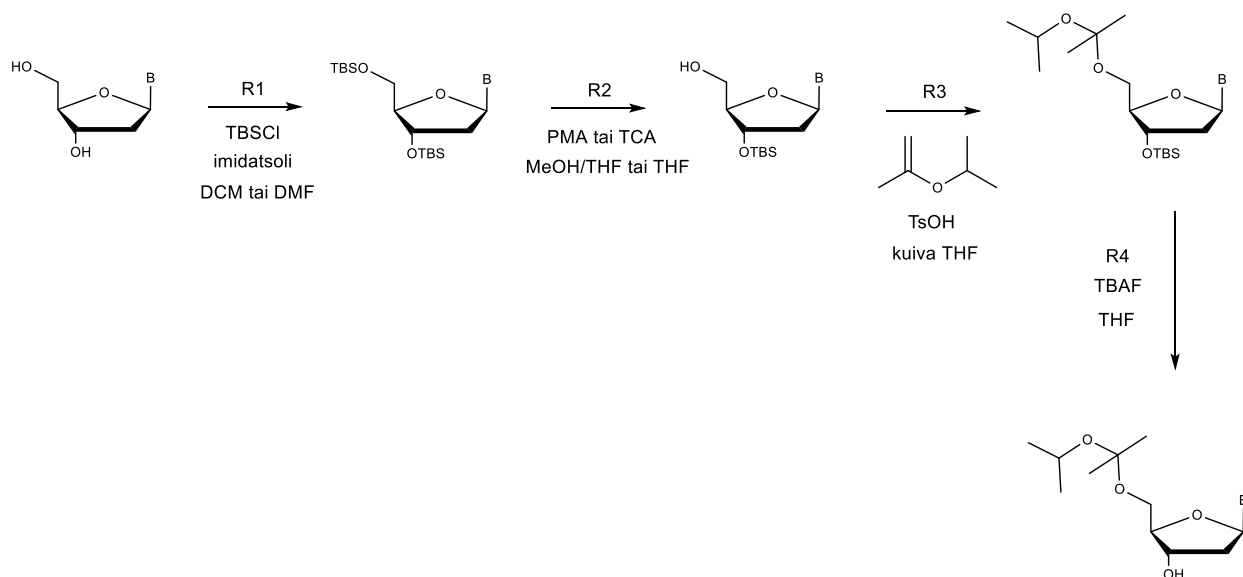
6 Johdanto

Oligonukleotidisyntetiikassa eri nukleotidit tulee saada liittymään toisiinsa tietyssä järjestyksessä ja oikealla tavalla. Yksittäisessä nukleotidissa on saman tyyppisiä ja samalla tavalla reagoivia funktionaalisia ryhmiä. Niiden reagointijärjestystä voidaan kontrolloida liittämällä niihin suojaryhmiä. Suojaryhmät tulee voida liittää ja poistaa selektiivisesti. Suojareaktiot tulee tapahtua miedoissa olosuhteissa, jotta ylimääräisiä reaktioita ei tapahtuisi. Nukleosidien suojaryhmiä kehitetään ja tutkitaan edelleen, jotta oligonukleotidisyntetiikasta saataisiin helpompaa ja nopeampaa.

Tämän työn tarkoituksena oli liittää asetaalisuojaus 2'-deoksi-adenosiinin, -guanosiinin ja sytidiinin 5'-hydroksyyliin. Suojareagenssina oli 2-isopropyylioksipropeeni. Reaktioissa käytettiin pääasiassa emäsuojattuja nukleosideja. Asetaalisuojausta ei ole mahdollista liittää selektiivisesti suoraan vain 5'-hydroksyyliin, joten synteesireiteistä tulee väistämättä monivaiheisia. Eräs tapa on silyloida selektiivisesti 5'-hydroksyyli, bentsoylloida 3'-hydroksyyli, poistaa selektiivisesti happolabiilimpi silyyli, liittää asetaalisuojaus 5'-hydroksyyliin ja lopuksi poistaa bentsoyylisuojaus sopivalla emäksellä. Tässä työssä tutkittiin lyhyempää reittiä. Ensin valmistettiin 3',5'-*O*-bissilyloituja nukleosideja, joista 5'-*O*-silyylisuojaus poistettiin selektiivisesti fosfomolybdeenihapolla (PMA) tai trikloorietikkahapolla (TCA). Tämän jälkeen 5'-hydroksyyli suojattiin asetaaliryhmällä, ja lopuksi poistettiin 3'-*O*-silyyli.

7 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Kaaviossa 1 on esitetty tässä työssä käytetty synteesireitti 5'-hydroksyylistään asetaalilla suojatun 2'-deoksinukleosidin valmistamiseksi. Siinä 2'-deoksinukleosidin emäsosa ja sen mahdollinen suojaryhmä on esitetty symbolilla B. Reaktioissa käytettiin emässuojaamatonta ja bentsoyylisuojusta 2'-deoksiadenosiinia, isobutyryylisuojusta 2'-deoksiguanosiinia sekä bentsoyylisuojusta 2'-deoksisytidiiniä.



Kaavio 1. Synteesireitti 2'-deoksinukleosidin 5'-hydroksyylin suojaamiseen asetaalina.

Välvaiheiden ja koko reaktiosarjan (RS) saannot on esitetty taulukossa 1. Suurin osa välituotteista puhdistettiin. Selektiivisen silyylin poiston (R2) jälkeen 2'-deoksiadenosiinin emäsosaan liitettiin bentsoyylisuojaus. Tämän reaktion saanto oli 69 %. Osa välireaktioista toistettiin useampia kertoja, mutta kokonaisuudessaan reitti tehtiin kunkin nukleosidin osalta vain kerran. Sytidiinin reaktiosarjan kokonaissaanto jäi pieneksi viimeisen vaiheen huonon saannon vuoksi.

Taulukko 1. Välireaktioiden ja koko synteesireitin saannot.

Emäsosa (B)	R1	R2	R3	R4	RS**
A	85 %	33 %, 35 %	-	-	-
A-Bz	149 %*	33 %, 41 %	72 %, 81 %	81 %, 86 %	36 %
G-isobutyryyli	96 %, 99 %, 120 %*	49 %	54 %, 59 %	94 %, 126 %	37 %
C-Bz	82 %, 88 %, 114 %*	45 %, 53 %, 56 %	88 %, 92 %	53 %, 99 %	22 %

*Saanto on laskettu puhdistamattomalle raakatuotteelle. **Reitti tehtiin kokonaisuudessaan vain kerran.

Silylointi (R1) oli suoraviivainen ja helposti suoritettava reaktio. Silylointireagenssin määrä ja reaktioaika vaihtelivat. Riittävä reaktioaika oli 16–44 h. Silyloituja nukleosideja ei tarvinnut puhdistaa jatkoreaktiota varten.

Silyylin selektiiviseen poistoon (R2) käytettiin kahta menetelmää. Toisessa perustana käytettiin Huang *et al.*⁴⁸ raportoimaa reaktiota, jossa katalyyttinä on fosfomolybdeenihappo (PMA). Menetelmää piti tosin muokata, jotta reaktiot saatiin lainkaan onnistumaan, ja siitä huolimatta saannot jäivät selvästi alle raportoidun n. 70–80 %:n. Julkaistussa menetelmässä liuottimena käytettiin metanolia, mutta lähtöaineet eivät lienneet siihen, eikä reaktio edennyt. Liuottimeksi vaihdettiin metanolin ja THF:n seos (1:1). Reaktio ei tapahdu THF:ssa, sillä myös metanolia tarvitaan hyökkääväksi ryhmäksi silyylin irtoamiseen.⁴⁸ Reaktiotuotetta ei aluksi saatu puhdistettua silikapylvässä huonon liukoisuuden vuoksi (DCM). Siksi menetelmään lisättiin uutto ennen puhdistusta. PMA:n kidevesien määrä vaihtelee. Kidevesien määräksi määritettiin 46 kpl, joten määritetystä vedestä kaikki ei voi olla kidevettä vaan osittain muuta kosteutta. Reagenssissa oleva veden määrä on niin suuri, että se täytyy ottaa huomioon ainemäärää laskettaessa. Erä PMA:ta kuivattiin, mutta kuivan reagenssin käyttö ei nopeuttanut reaktiota. Huang *et al.*⁴⁸ ilmoittivat riittäväksi PMA:n pitoisuudeksi 20 %-mol ja reaktioajaksi 6–8 h. Vaihdetulla liuotinsysteemillä sopivaksi PMA:n pitoisuudeksi osoittautui 35 %-mol ja reaktioajaksi n. 2,5 h. Huonon liukoisuuden vuoksi 2'-deoksiadenosiinin selektiivistä silyylin poistoa ei saatu onnistumaan PMA-reaktiolla, vaan käytettiin toista menetelmää, jossa katalyyttinä on trikloorietikkahappo (TCA). TCA-reaktio perustuu Zhu *et al.*⁴⁹ julkaisemaan menetelmään.

Siinä liuottimena on THF, johon 2'-deoksiadenosiini liukenee hyvin. Reaktion saannot jäivät kuitenkin vain n. 35 %:iin. TCA-reaktio on menetelmistä hieman työläämpi, koska siinä valmistetaan TCA-vesi-liuos ja reaktio tapahtuu jäähauteessa, kun taas PMA lisätään kuivana ja reaktio tapahtuu huoneenlämmössä.

Asetaalisuojausreaktio (R3) tehtiin Liang *et al.*³⁷ julkaisemalla menetelmällä. Siinä suojaryhmä liitettiin *para*-tolueenisulfonihapon (TsOH) katalysoimana. Reaktioaika vakioitiin viideksi minuutiksi. Koska reaktio oli nopea, sitä ei voitu seurata ohutkerroskromatografialla. Reaktio on kuitenkin herkkä reaktioajan ja katalyytin määrän suhteen, koska liian lyhyellä ajalla tai pienellä katalyytin määrällä reaktio ei mene loppuun ja liian pitkä reaktioaika tai suuri katalyytin määrä johtaa sivutuotteiden muodostumiseen. Sopiva katalyytin määrä pyrittiin selvittämään testireaktioilla ennen varsinaista reaktiota. Liian suuri katalyytin määrä eliminoi asetaalisuojaryhmän vinyylieetteriksi. Vinyylieetteriä oli usein hieman puhdistetun tuotteen seassa. Asetaalisuojattu tuote saattaa hajota vinyylieetteriksi myös puhdistuksessa.

3'-*O*-silyylin poistaminen (R4) oli suoraviivainen ja helposti toteutettava reaktio. Tetrabutyyliammoniumia tosin tuli kerran tuotteen joukkoon. Kerran reaktio osittain epäonnistui. Tällöin liuotinta oli 15 % liian vähän ja reaktioseos oli huomattavan kullan ruskea.

Reaktiosarja koostui pääosin suoraviivaisista ja helposti toteutettavista reaktioista. Työläintä oli puhdistaminen lähes jokaisen välivaiheen jälkeen. Puhdistamiseen käytettiin silikapylvästä, mikä lisäksi kuluttaa suuria määriä liuottimia. Tässä työssä puhtaat välituotteet olivat tärkeitä, kun haluttiin varmistua niiden rakenteiden oikeellisuudesta. Jos tavoitteena on saada vain lopputuote nopeasti ja vaivattomasti, tulisi pohtia puhdistusten vähentämistä. Silyylin selektiivinen poistaminen TCA:lla 2'-deoksiadenosiinista oli hieman työläämpi ja siinä oli huonompi saanto kuin PMA-reaktiossa. Voisi olla mahdollista muokata liuotinsysteemiä ja tehdä selektiivinen silyylin poisto PMA-reaktiolla myös 2'-deoksiadenosiinille ja saada ainakin sama saanto kuin TCA-reaktiolla.

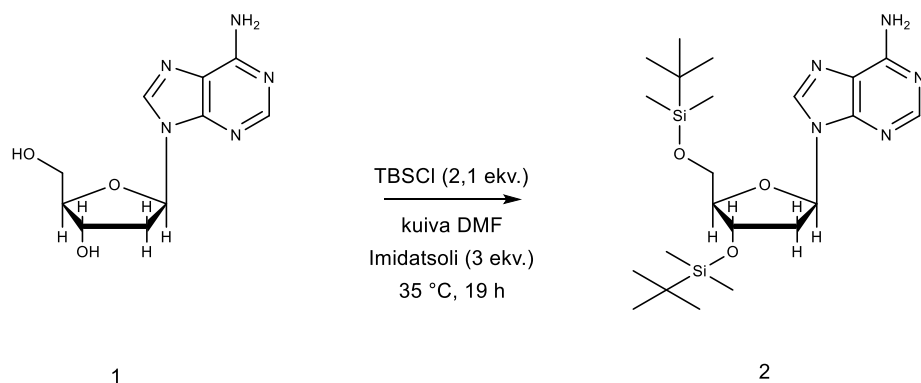
8 Menetelmät

8.1 Yleiset menetelmät

Reaktioiden etenemistä seurattiin TLC-levyjen avulla. Lähtöaineiden ja tuotteiden kromofori havaittiin UV-lampulla. Ajoliuoksena oli pääasiassa 5 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Reaktiotuotteiden puhdistamiseen käytettiin silikakromatografiaa. Ajoliuoksena oli 0-5 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Käytettiin gradienttieroitusta. Ajoliuokset sisälsivät TEA:a, jotta happolabiilit reaktiotuotteet eivät hajoaisi. Tuotteista ajettiin ^1H -NMR-spektrit 400 tai 500 MHz:n laitteella. Asetaalisuojatuista tuotteista ajettiin lisäksi ^{13}C -NMR-spektrit 125 tai 150 MHz:n laitteella ja MS-spektrit ESI-TOF-massaspektrometrillä.

8.2 2'-deoksinukleosidien 3',5'-bis-silyloiminen

8.2.1 3',5'-O-di(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini

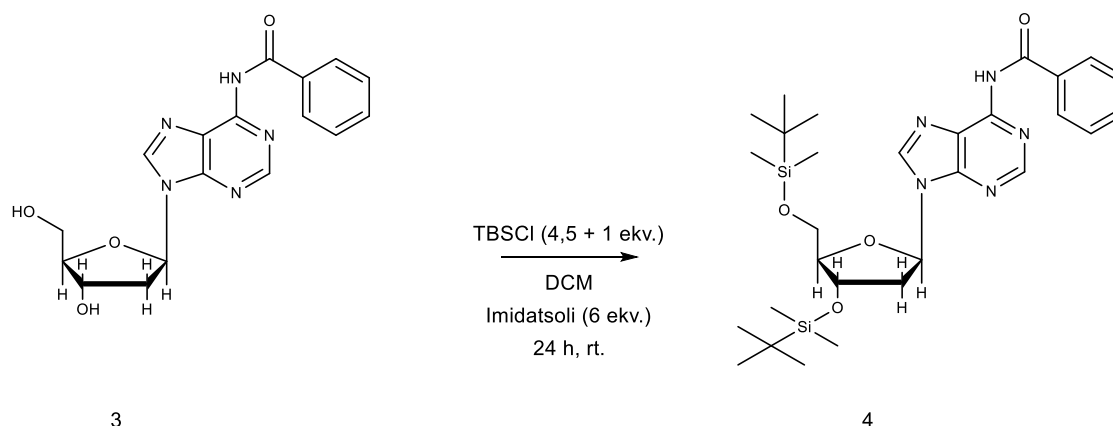


2'-deoksiadenosiini **1** (5,1 g, 20,2 mmol) liuotettiin pyridiiniin (60 ml) ja haihdutettiin kuiviin, minkä jälkeen se liuotettiin kuivaan pyridiiniin (60 ml) ja haihdutettiin kuiviin. Tämän jälkeen se liuotettiin DMF:iin (30 ml). Lisättiin imidatsoli (3,9 g, 56,9 mmol) ja TBSCl (6,3 g, 41,6 mmol). Annettiin reagoida 19 h 35 °C:ssa argonatmosfäärissä. Haihdutettiin kuiviin öljypumpulla. Liuotettiin veteen (100 ml) ja uutettiin etyyliasetaatilla (2 · 100 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin

Na₂SO₄:lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuumilinjassa. Puhdistettiin silikapylväessä (500 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 2000 ml AcOEt/DCM 1:1, 500 ml AcOEt/DCM/EtOH 8:10:1 ja 1000 ml AcOEt/DCM/EtOH 4:5:1. Saanto oli 8,3 g (85 %).

¹H-NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ 8,28 (s; 1H; H₂); 8,12 (s; 1H; H₈); 7,27 (s; 2H; NH₂); 6,32 (t; *J*=6,8 Hz; 1H; H_{1'}); 4,62 (m; 1H; H_{3'}); 3,84 (m; 1H; H_{4'}); 3,81 (dd; *J*=5,9; 10,8 Hz; 1H; H_{5'}); 3,65 (dd; *J*=4,3; 10,8 Hz; 1H; H_{5''}); 2,92 (m; 1H; H_{2'}); 2,29 (m; 1H; H_{2''}); 0,90 ja 0,85 (s; 18H; 2 x SiC(CH₃)₃); 0,11; 0,02 ja 0,00 (s; 12H; 2 x Si(CH₃)₂)

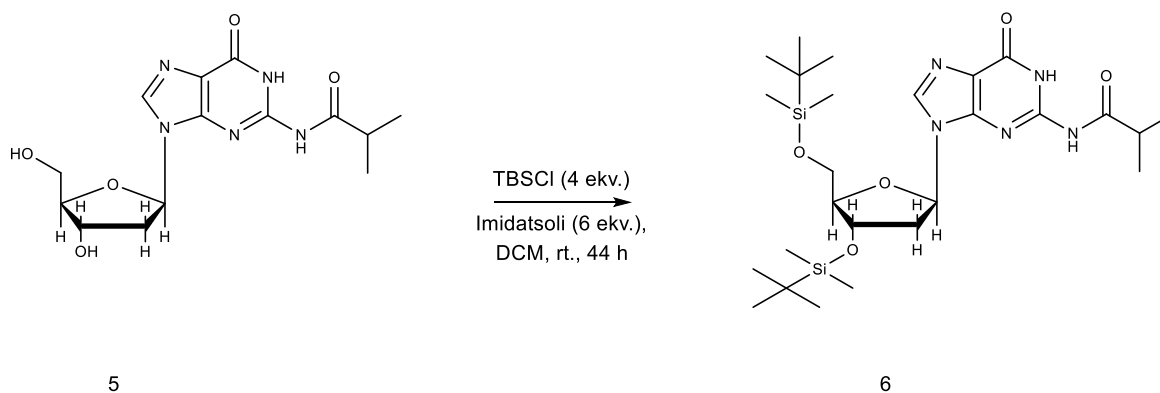
8.2.2 *N*⁶-bentsoyyli-3',5'-*O*-di(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini



*N*⁶-bentsoyyli-2'-deoksiadenosiini **3** (4,5 g, 12,6 mmol), imidatsoli (5,1 g, 75,4 mmol) ja TBSCl (8,5 g, 56,6 mmol) sekoitettiin DCM:iin (200 ml) ja annettiin reagoida huoneenlämmössä ensin 19,5 h, minkä jälkeen lisättiin yksi ekvivalentti TBSCl:a (1,6 g, 12,6 mmol). Reaktiota jatkettiin vielä 4,5 h. Reaktioseos laimennettiin DCM:lla (150 ml) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (3 · 200 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (200 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (200 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuumilinjassa. Raakatuotteen saanto oli 10,9 g (149 %).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 11,16 (s; 1H; NH); 8,74 (s; 1H; H2); 8,61 (s; 1H; H8); 8,04 (d; *J*=7,6 Hz; 2H; Bz-*o*); 7,65 (t; *J*=7,3 Hz; 1H; Bz-*p*); 7,55 (t; *J*=7,6 Hz; 2H; Bz-*m*); 6,47 (t; *J*=6,7 Hz; 1H; H1'); 5,06 (t; *J*=5,0 Hz; 1H; 5'-OH); 4,67 (m; 1H; H3'); 3,90 (m; 1H; H4'); 3,82 (dd; *J*=6,0; 11,0 Hz; 1H; H5'); 3,69 (dd; *J*=4,5; 10,8 Hz; 1H; H5''); 3,00 (m; 1H; H2'); 2,33 (m; 1H; H2''); 0,84 (s; 18H; 2 x SiC(CH₃)₃); 0,01 ja -0,04 (s; 12H; 2 x Si(CH₃)₂)

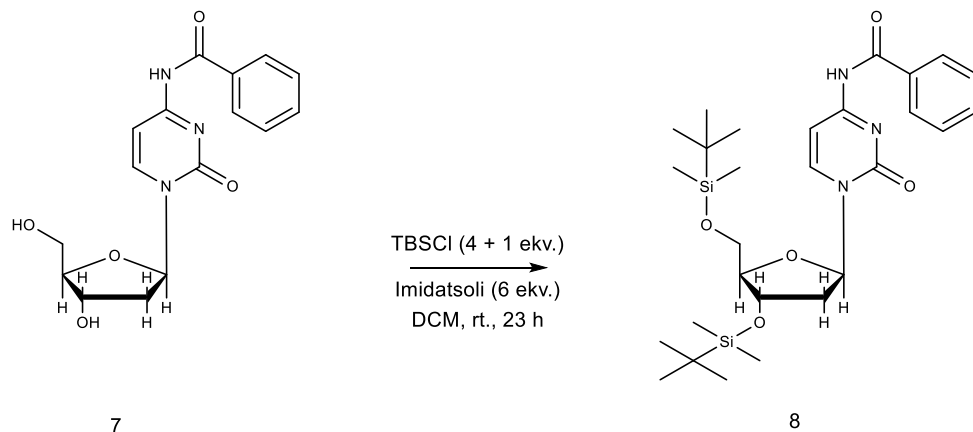
8.2.3 3',5'-*O*-di(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi-*N*²-isobutyryyliguanosiini



2'-deoksi-*N*²-isobutyryyliguanosiini **5** (4,2 g, 12,3 mmol), imidatsoli (5,0 g, 73,8 mmol) ja TBSCl (7,4 g, 49,2 mmol) sekoitettiin DCM:iin (200 ml) ja annettiin reagoida huoneenlämmössä 21 h. Reaktioseos laimennettiin DCM:lla (200 ml) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (3 · 250 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (250 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (300 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuuminjassa. Raakatuotteen saanto oli 8,4 g (120 %).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 12,07 (s; 1H; N1-H); 11,65 (s; 1H; NH); 8,19 (s; 1H; H8); 6,20 (t; *J*=6,8 Hz; 1H; H1'); 4,51 (m; 1H; H3'); 3,84 (m; 1H; H4'); 3,71 (dd; *J*=5,9; 11,1 Hz; 1H; H5'); 3,64 (m; 1H; H5''); 2,80-2,68 (m; 2H; *t*-CH ja H2'); 2,31 (m; 1H; H2''); 1,12 (d; *J*=6,8 Hz; 6H; *i*-Bu C(CH₃)₂); 0,88 ja 0,86 (s; 18H; 2 x SiC(CH₃)₃); 0,10 ja 0,03 (s; 12H; 2 x Si(CH₃)₂)

8.2.4 *N*⁴-bentsoyyli-3',5'-*O*-di(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksisytidiini

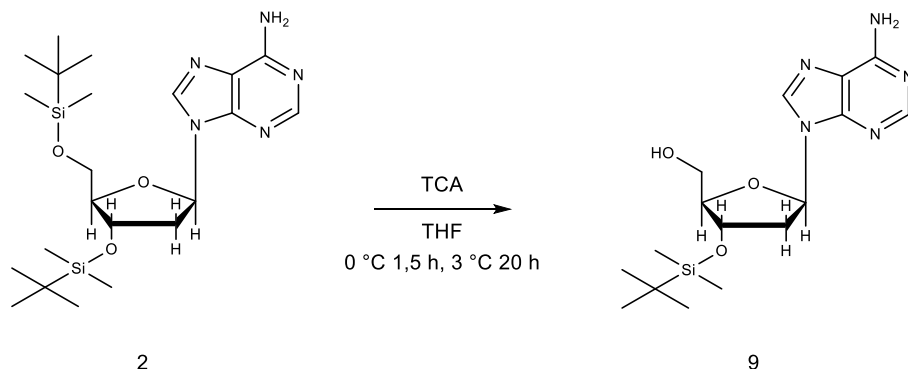


*N*⁴-bentsoyyli-2'-deoksisytidiini **7** (3,0 g, 9,1 mmol), imidatsoli (3,7 g, 54,3 mmol) ja TBSCl (5,5 g, 36,2 mmol) sekoitettiin DCM:iin (150 ml) ja annettiin reagoida huoneenlämmössä ensin 6 h, minkä jälkeen lisättiin yksi ekvivalentti TBSCl:a (1,4 g, 9,1 mmol). Reaktiota jatkettiin vielä 17 h. Reaktioseos laimennettiin DCM:lla (150 ml) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (2 · 200 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (2 · 100 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (2 · 100 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuuminlinjassa. Puhdistettiin silikapylväessä (350 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 1000 ml 0 % -, 1000 ml 1 % - ja 1500 ml 2 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Saanto oli 4,2 g (82 %).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 11,26 (s; 1H; NH); 8,28 (d; *J*=7,6 Hz; 1H; H6); 8,00 (d; *J*=8,6 Hz; 2H; Bz-*o*); 7,63 (t; *J*=7,4 Hz; 1H; Bz-*p*); 7,52 (t; *J*=7,9 Hz; 2H; Bz-*m*); 7,37 (d; *J*=7,5 Hz; 1H; H5); 6,13 (t; *J*=6,1 Hz; 1H; H1'); 4,39 (m; 1H; H3'); 3,91 (m; 1H; H4'); 3,85 (dd; *J*=4,0; 11,4 Hz; 1H; H5'); 3,76 (dd; *J*=3,2; 11,4 Hz; 1H; H5''); 2,33 (m; 1H; H2'); 2,19 (m; 1H; H2''); 0,90 ja 0,88 (s; 18H; 2 x SiC(CH₃)₃); 0,10 ja 0,08 (s; 12H; 2 x Si(CH₃)₂)

8.3 3',5'-*O*-di(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksinukleosidien selektiivinen 5'-desilyloiminen

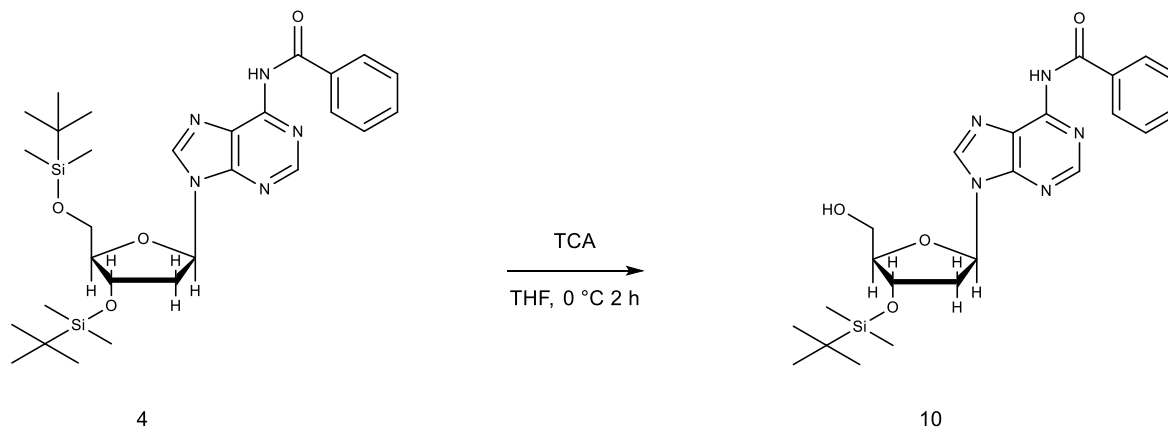
8.3.1 3'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini



Valmistettiin TCA:n vesiliuos (10,0 g / 5,0 ml). 3',5'-*O*-di(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini **2** (1,0 g, 2,1 mmol) liuotettiin THF:iin (10 ml). Lisättiin jäähdytetty TCA-vesiliuos (2,5 ml) tipoittain jäähäuteessa samalla sekoittaen. Annettiin reagoida jäähäuteessa 1,5 h ja 3 °C:ssa 20 h. Reaktioseos laimennettiin DCM:lla (100 ml) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (2 · 100 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (75 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (2 · 100 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuuminlinjassa. Puhdistettiin silikapylväässä (200 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 500 ml 0 % -, 500 ml 1 % -, 1000 ml 2 % -, 700 ml 3 % - ja 1000 ml 5 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Saanto oli 0,3 g (35 %).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 8,34 (s; 1H; H2); 8,13 (s; 1H; H8); 7,30 (s; 2H; NH₂); 6,33 (t; *J*=7,0 Hz; 1H; H1'); 5,26 (t; *J*=5,8 Hz; 1H; 5'-OH); 4,59 (m; 1H; H3'); 3,87 (m; 1H; H4'); 3,61 (m; 1H; H5'); 3,51 (m; 1H; H5''); 2,83 (m; 1H; H2'); 2,25 (m; 1H; H2''); 0,90 (s; 9H; SiC(CH₃)₃); 0,11 (s; 6H; Si(CH₃)₂)

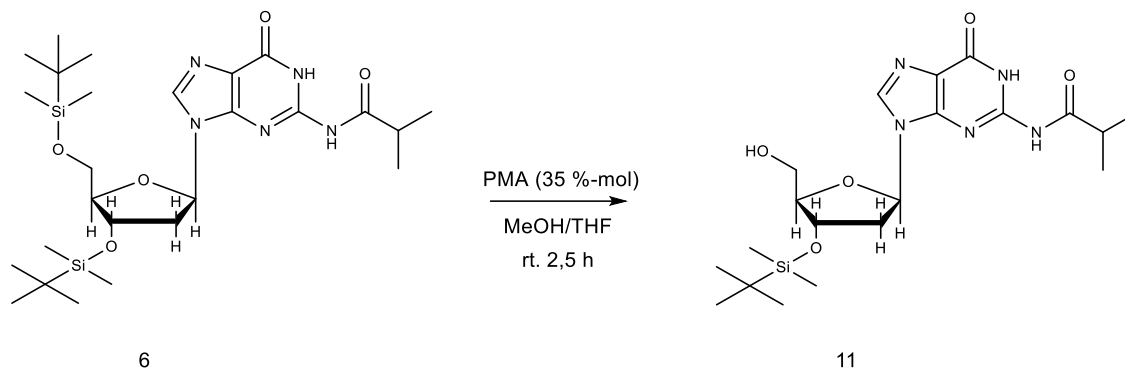
8.3.2 *N*⁶-bentsoyyli-3'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini



Valmistettiin TCA:n vesiliuos (20,1 g / 10,0 ml). *N*⁶-bentsoyyli-3',5'-*O*-di(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini **4** (3,8 g, 2,1 mmol) liuotettiin THF:iin (32 ml). Lisättiin jäähdytetty TCA-vesiliuos tipoittain jäähauteessa samalla sekoittaen. Annettiin reagoida jäähauteessa 2 h. Reaktioseos laimennettiin DCM:lla (150 ml) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (4 · 100 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (100 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (150 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla. Liutotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuumilinjassa. Raakatuotteen saanto oli 2,3 g. Puhdistettiin silikapylväässä (400 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 1000 ml 1 % - ja 1500 ml 2 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Saanto oli 1,0 g (33 %).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 11,19 (s; 1H; NH); 8,75 (s; 1H; H2); 8,70 (s; 1H; H8); 8,05 (d; *J*=7,6 Hz; 2H; Bz-*o*); 7,64 (t; *J*=7,6 Hz; 1H; Bz-*p*); 7,55 (t; *J*=7,8 Hz; 2H; Bz-*m*); 6,48 (t; *J*=6,8 Hz; 1H; H1'); 5,07 (t; *J*=5,5 Hz; 1H; 5'-OH); 4,65 (m; 1H; H3'); 3,90 (m; 1H; H4'); 3,64 (m; 1H; H5'); 3,54 (m; 1H; H5''); 2,92 (m; 1H; H2'); 2,36 (m; 1H; H2''); 0,91 (s; 9H; SiC(CH₃)₃); 0,13 (s; 6H; Si(CH₃)₂)

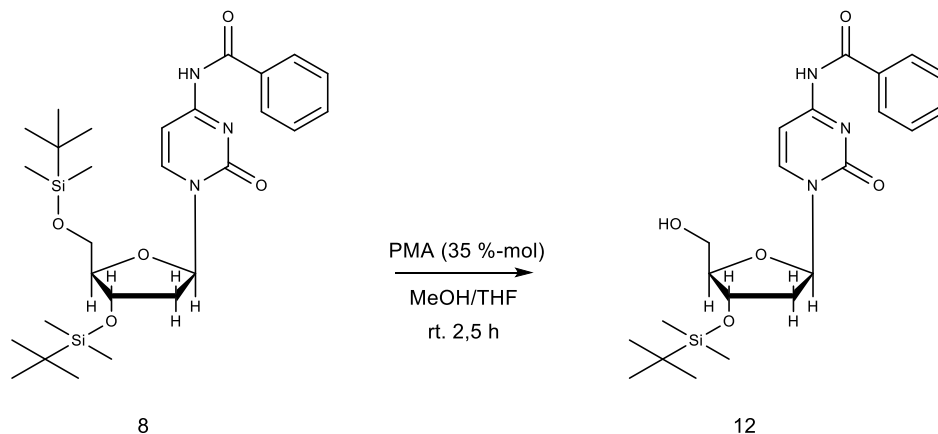
8.3.3 3'-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi-*N*²-isobutyryyliguanosiini



3',5'-O-di(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi-*N*²-isobutyryyliguanosiini **6** (8,3 g, 14,7 mmol) ja PMA (13,3 g, 5,1 mmol) liuotettiin MeOH/THF (1:1)-seokseen (290 ml), jolloin lähtöaineen **6** konsentraatioksi saatiin 0,05 M. Annettiin reagoida huoneenlämmössä 2,5 h. Reaktio pysäytettiin lisäämällä TEA:a (13,5 ml). Muodostunut sakka suodatettiin. Suodos haihdutettiin osittain. Jäännös laimennettiin DCM:lla (300 ml) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (3 · 200 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (200 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (200 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuuminjassa. Raakatuotteen saanto oli 5,2 g. Puhdistettiin silikapylväässä (500 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 1000 ml 1 % -, 1000 ml 2 % - ja 2500 ml 3 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Saanto oli 3,3 g (49 %).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 12,07 (s; 1H; N1-H); 11,64 (s; 1H; NH); 8,25 (s; 1H; H8); 6,19 (t; *J*=6,9 Hz; 1H; H1'); 5,01 (t; *J*=5,4; 5'-OH); 4,53 (m; 1H; H3'); 3,83 (m; 1H; H4'); 3,58-3,46 (m; 2H; H5' ja H5''); 2,84-2,64 (m; 2H; *t*-CH ja H2'); 2,27 (m; 1H; H2''); 1,12 (d; *J*=6,8 Hz; 6H; *i*-Bu C(CH₃)₂); 0,89 (s; 9H; SiC(CH₃)₃); 0,11 (s; 6H; Si(CH₃)₂)

8.3.4 *N*⁴-bentsoyyli-3'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksisytidiini



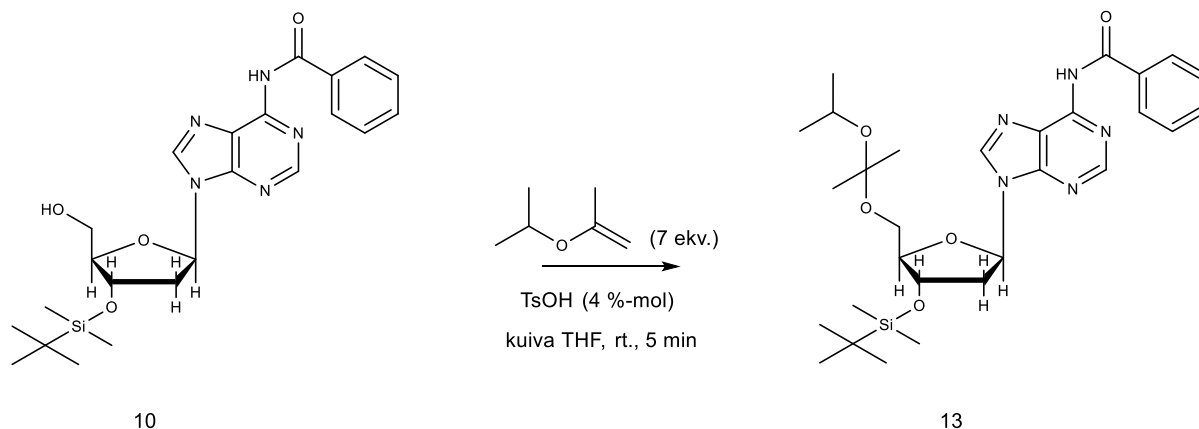
*N*⁴-bentsoyyli-3',5'-*O*-di(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksisytidiini **8** (2,4 g, 4,2 mmol) ja PMA (3,8 g, 1,5 mmol) liuotettiin MeOH/THF (1:1)-seokseen (85 ml), jolloin lähtöaineen **8** konsentraatioksi saatiin 0,05 M. Annettiin reagoida huoneenlämmössä 2,5 h. Reaktio pysäytettiin lisäämällä TEA:a (6 ml). Muodostunut sakka suodatettiin. Suodos haihdutettiin osittain. Jäännös laimennettiin DCM:lla (150 ml) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (3 · 100 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (100 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (100 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuumilinjassa. Raakatuotteen saanto oli 5,2 g. Puhdistettiin silikapylväässä (300 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 1000 ml 1 % - ja 1500 ml 2 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Saanto oli 1,1 g (56 %).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 11,24 (s; 1H; NH); 8,37 (d; *J*=7,4 Hz; 1H; H6); 8,01 (d; *J*=7,4 Hz; 2H; Bz-*o*); 7,62 (t; *J*=7,5 Hz; 1H; Bz-*p*); 7,51 (t; *J*=7,9 Hz; 2H; Bz-*m*); 7,37 (d; *J*=7,1 Hz; 1H; H5); 6,13 (t; *J*=6,3 Hz; 1H; H1'); 5,12 (t; *J*=5,2 Hz; 5'-OH); 4,43 (m; 1H; H3'); 3,88 (m; 1H; H4'); 3,68-3,54 (m; 2H; H5' ja H5''); 2,30 (m; 1H; H2'); 2,14 (m; 1H; H2''); 0,88 (s; 9H; SiC(CH₃)₃); 0,09 (s; 6H; Si(CH₃)₂)

8.4 3'-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksinukleosidien asetaalisuojaaminen 2-isopropyylioksiopropeenilla

5'-hydroksyylin

8.4.1 *N*⁶-bentsoyyli-3'-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi- 5'-O-(2-isopropoksiopropan-2-yl)adenosiini



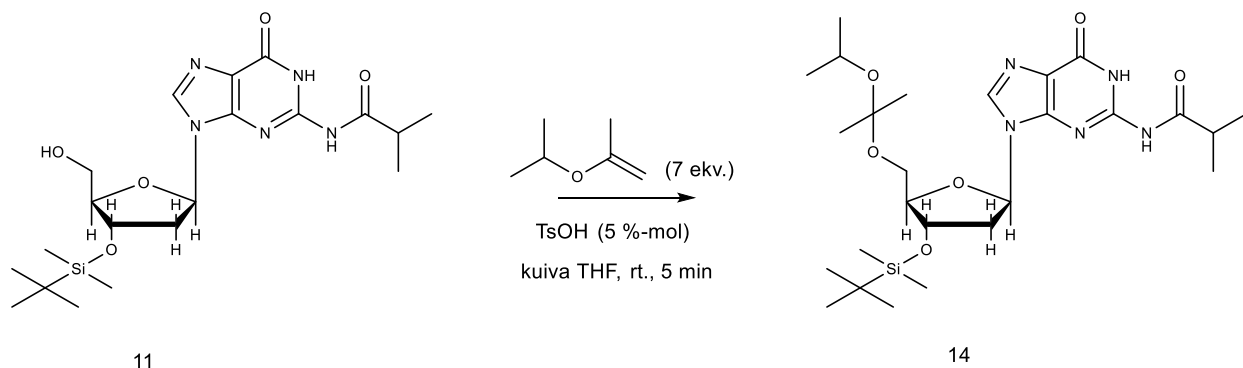
*N*⁶-bentsoyyli-3'-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini **10** (3,4 g, 7,2 mmol) liuotettiin kuivaan THF:iin (17 ml). Lisättiin 2-isopropyylioksiopropeeni (1,6 ml, 12,5 mmol) ja kuiva 0,1 M TsOH/THF-liuos (0,90 ml), ja annettiin reagoida huoneenlämmössä 5 min. Reaktio lopetettiin TEA:lla (2 ml). Haihdutettiin osittain. Jäännös laimennettiin DCM:lla (50 ml) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (3 · 50 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (50 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (50 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuumilinjassa. Puhdistettiin silikapylväessä (200 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 500 ml 0 % - ja 2000 ml 1 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Saanto oli 0,7 g (72 %).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 11,21 (s; 1H; NH); 8,74 (s; 1H; H2); 8,63 (s; 1H; H8); 8,05 (d; *J*=7,6 Hz; 2H; Bz-*o*); 7,64 (t; *J*=7,4 Hz; 1H; Bz-*p*); 7,55 (t; *J*=7,7 Hz; 2H; Bz-*m*); 6,47 (t; *J*=6,3 Hz; 1H; H1'); 4,72 (m; 1H; H3'); 3,89 (m; 1H; H4'); 3,78 (m; 1H; as. *t*-CH); 3,64 (dd; *J*=4,9; 10,4 Hz; 1H; H5'); 3,49 (dd; *J*=5,2; 10,4 Hz; 1H; H5''); 2,98 (m; 1H; H2'); 2,41 (m; 1H; H2''); 1,24 (s; H6; as. C(CH₃)₂); 0,98 (d; *J*=6,4 Hz; 6H; as. CH(CH₃)₂); 0,91 (s; 9H; SiC(CH₃)₃); 0,14 (s; 6H; Si(CH₃)₂)

^{13}C -NMR (125 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,50 (C=O); 151,90 (C4); 151,47 (C2); 150,34 (C6); 143,16 (C8); 133,40 (Bz); 132,36 (Bz-*p*); 128,44 (Bz-*o*); 128,40 (Bz-*m*); 125,89 (C5); 99,80 (as. O-C-O); 85,81 (C4'); 83,39 (C1'); 72,31 (C3'); 62,49 (*t*-C); 60,63 (C5'); 38,76 (C2'); 25,28; 25,64 ja 25,62 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 25,43 (as. $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 24,15 ja 24,07 (as. $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 17,70 (*t*-C-Si); -4,81 ja -5,02 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$)

(ESI⁺)-TOF-MS: laskennallinen m/z molekkylikaavalle $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_5\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 570,3106; havaittu 570,3115

8.4.2 3'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi-*N*²-isobutyryyli-5'-*O*-(2-isopropoksipropan-2-yl)guanosiini



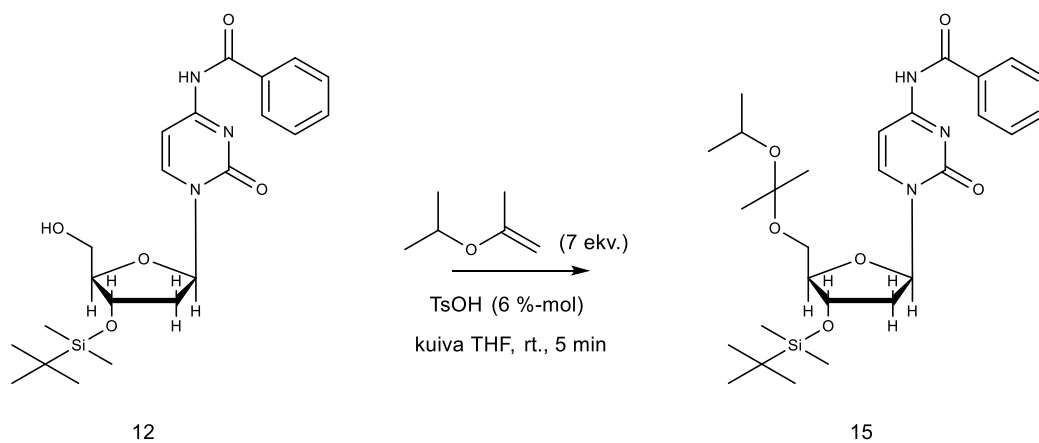
3'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi-*N*²-isobutyryyliguanosiini **11** (1,2 g, 2,7 mmol) liuotettiin kuivaan THF:iin (24 ml). Lisättiin 2-isopropyylioksiopropeeni (2,3 ml, 18,6 mmol) ja kuiva 0,1 M TsOH/THF-liuos (1,33 ml), ja annettiin reagoida huoneenlämmössä 5 min. Reaktio lopetettiin TEA:lla (2,5 ml). Haihdutettiin osittain. Jäännös laimennettiin DCM:lla (50 ml + 0,1 % TEA) ja uutettiin kylläisellä NaHCO_3 -liuoksella ($3 \cdot 50$ ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (50 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (50 ml + 0,1 % TEA). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO_4 :lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuuminlinjassa. Raakatuotteen saanto oli 1,2 g. Puhdistettiin silikapylväässä (200 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 500 ml 0 % -, 500 ml 1 % - ja 1500 ml 2 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Saanto oli 0,8 g (54 %).

^1H -NMR (400 MHz; DMSO- d_6) δ 12,07 (s; 1H; N1-H); 11,65 (s; 1H; NH); 8,21 (s; 1H; H8); 6,19 (t; $J=6,5$ Hz; 1H; H1'); 4,54 (m; 1H; H3'); 3,89 (m; 1H; H4'); 3,80 (m; 1H; as. t -CH); 3,58-3,43 (m; 2H; H5' ja H5''); 2,82-2,70 (m; 2H; t -CH ja H2'); 2,32 (m; 1H; H2''); 1,26 (s; H6; as. $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,12 (d; $J=6,8$ Hz; 6H; i -Bu $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 0,99 (d; $J=6,2$ Hz; 6H; as. $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0,88 (s; 9H; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,11 (s; 6H; $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$)

^{13}C -NMR (125 MHz; DMSO- d_6) δ 180,05 (i -Bu $\text{C}=\text{O}$); 154,77 (C6); 148,50 (C4); 148,07 (C2); 137,25 (C8); 120,17 (C5); 99,86 (as. O-C-O); 85,96 (C4'); 82,43 (C1'); 72,33 (C3'); 62,50 (as. t -C); 60,58 (C5'); 39,08 (C2'); 34,70 (t -C); 25,62 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 25,46 ja 25,41 (as. $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 24,16 ja 24,12 (as. $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 18,82 ja 18,77 (i -Bu $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 17,67 (t -C-Si); -4,87 ja -5,07 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$)

(ESI+)-TOF-MS: laskennallinen m/z molekyylikaavalle $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_6\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 552,3212; havaittu 552,3223

8.4.3 N^4 -bentsoyyli-3'- O -($tert$ -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi-5'- O -(2-isopropoksipropan-2-yl)sytidiini



N^4 -bentsoyyli-3'- O -($tert$ -butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksisytidiini **12** (4,0 g, 9,1 mmol) liuotettiin kuivaan THF:iin (81 ml). Lisättiin 2-isopropyylioksiopropeeni (8,0 ml, 63,5 mmol) ja kuiva 0,1 M TsOH/THF-liuos (5,44 ml), ja annettiin reagoida huoneenlämmössä 5 min. Reaktio lopetettiin TEA:lla (10 ml). Haihdutettiin osittain. Jäännös laimennettiin DCM:lla

(200 ml + 0,1 % TEA) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (3 · 200 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (200 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (200 ml + 0,1 % TEA). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuuminjassa. Raakatuotteen saanto oli 4,9 g. Puhdistettiin silikapylväässä (400 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 1000 ml 0 % -, 1000 ml 1 % - ja 2000 ml 2 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Saanto oli 4,6 g (92 %).

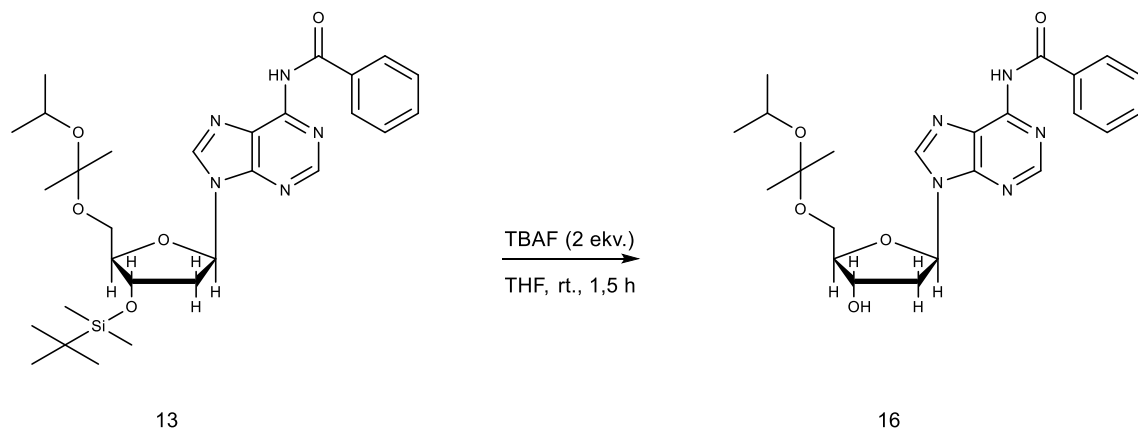
¹H-NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 11,25 (s; 1H; NH); 8,29 (d; *J*=7,4 Hz; 1H; H6); 8,01 (d; *J*=7,5 Hz; 2H; Bz-*o*); 7,62 (t; *J*=7,4 Hz; 1H; Bz-*p*); 7,51 (t; *J*=7,8 Hz; 2H; Bz-*m*); 7,40 (d; *J*=7,4 Hz; 1H; H5); 6,14 (t; *J*=6,1 Hz; 1H; H1'); 4,39 (m; 1H; H3'); 4,00-3,90 (m; 2H; H4' ja as. *t*-CH); 3,63 (dd; *J*=4,1 Hz, 10,7 Hz; 1H; H5'); 3,62 (dd; *J*=4,3 Hz, 10,7 Hz; 1H; H5''); 2,32 (m; 1H; H2'); 2,20 (m; 1H; H2''); 1,33 ja 130 (s; H6; as. C(CH₃)₂); 1,09 (d; *J*=6,2 Hz; 6H; as. CH(CH₃)₂); 0,87 (s; 9H; SiC(CH₃)₃); 0,08 (s; 6H; Si(CH₃)₂)

¹³C-NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆) δ 167,20 (Bz-C=O); 163,04 (C4); 154,32 (C2); 144,74 (C6); 132,97 (Bz-*p*); 132,64 (Bz); 128,39 (Bz-*o* ja Bz-*m*); 100,00 (as. O-C-O); 95,89 (C5); 86,00 ja 85,95 (C1' ja C4'); 71,61 (C3'); 62,78 (as. *t*-C); 60,19 (C5'); 40,77 (C2'); 25,58 (SiC(CH₃)₃); 25,45 ja 25,39 (as. C(CH₃)₂); 24,31 ja 24,18 (as. CH(CH₃)₂); 17,64 (*t*-C-Si); -4,83 ja -5,07 (Si(CH₃)₂)

(ESI⁺)-TOF-MS: laskennallinen *m/z* molekyylikaavalle C₂₈H₄₄N₃O₆Si [M+H]⁺ 546,2994; havaittu 546,2999

8.5 3'-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi- 5'-O-(2-isopropoksipropan-2-yl)nukleosidien 3'-desilyloiminen

8.5.1 *N*⁶-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-O-(2-isopropoksipropan-2-yl)adenosiini



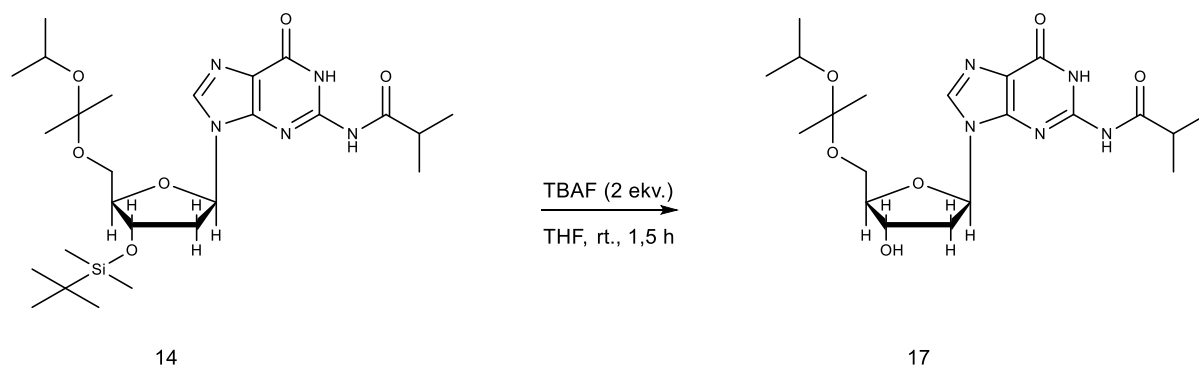
*N*⁶-bentsoyyli-3'-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi-5'-O-(2-isopropoksipropan-2-yl)adenosiini **13** (3,2 g, 5,7 mmol) ja TBAF (3,0 g, 11,3 mmol) liuotettiin THF:iin (70 ml). Annettiin reagoida huoneenlämmössä 1,5 h. Reaktioseos laimennettiin DCM:lla (500 ml + 0,1 % TEA) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (3 · 250 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (200 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (300 ml + 0,1 % TEA). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuuminjassa. Raakatuotteen saanto oli 4,2 g. Puhdistettiin silikapylväässä (350 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 1000 ml 1 % -, 1000 ml 2 % -, 1000 ml 3 % - ja 1500 ml 4 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Saanto oli 2,1 g (81 %).

¹H-NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ 11,16 (s; 1H; NH); 8,74 (s; 1H; H2); 8,60 (s; 1H; H8); 8,04 (d; *J*=7,5 Hz; 2H; Bz-*o*); 7,65 (t; *J*=7,5 Hz; 1H; Bz-*p*); 7,55 (t; *J*=7,5 Hz; 2H; Bz-*m*); 6,47 (t; *J*=6,5 Hz; 1H; H1'); 5,42 (d; *J*=4,6 Hz; 1H; 3'-OH); 4,52 (m; 1H; H3'); 3,95 (m; 1H; H4'); 3,78 (m; 1H; as. *t*-CH); 3,65 (dd; *J*=4,1, 10,6 Hz; 1H; H5'); 3,51 (dd; *J*=5,3, 10,6 Hz; 1H; H5''); 2,86 (m; 1H; H2''); 2,41 (m; 1H; H2''); 1,25 (s; H6; C(CH₃)₂); 0,98 ja 0,95 (d; *J*=6,1 Hz; 6H; CH(CH₃)₂)

^{13}C -NMR (125 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,51 (C=O); 151,96 (C4); 151,51 (C2); 150,28 (C6); 142,93 (C8); 133,32 (Bz); 132,35 (Bz-*p*); 128,42 (Bz-*o* ja Bz-*m*); 125,78 (C5); 99,79 (as. O-C-O); 85,89 (C4'); 83,29 (C1'); 70,46 (C3'); 62,42 (*t*-C); 61,04 (C5'); 40,27-38,75 (C2'); 25,53 ($\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_2$); 24,14 ($\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2$)

(ESI+)-TOF-MS: laskennallinen m/z molekyylikaavalle $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 456,2241; havaittu 456,2241

8.5.2 2'-deoksi- N^2 -isobutyryyli-5'- O -(2-isopropoksipropan-2-yl)guanosiini



3'- O -(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksi- N^2 -isobutyryyli-

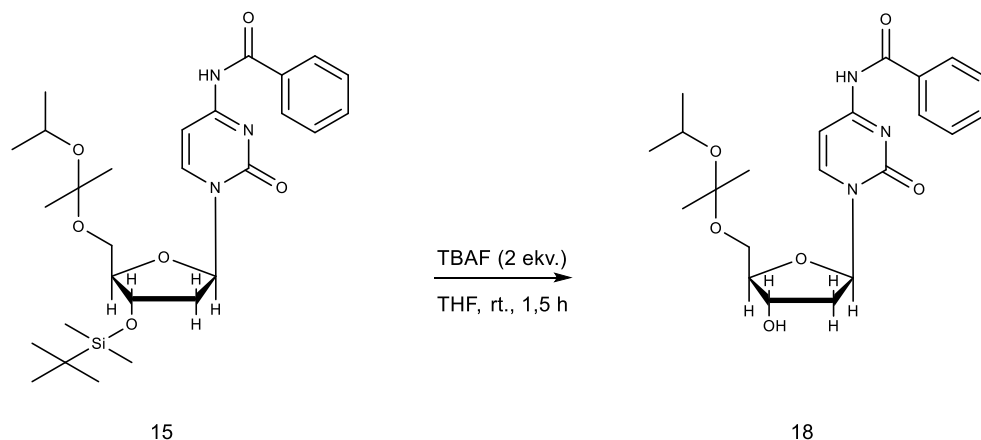
5'- O -(2-isopropoksipropan-2-yl)guanosiini **14** (2,2 g, 4,9 mmol) ja TBAF (2,6 g, 9,8 mmol) liuotettiin THF:iin (42 ml). Annettiin reagoida huoneenlämmössä 1,5 h. Reaktioseos laimennettiin DCM:lla (400 ml + 0,1 % TEA) ja uutettiin kylläisellä NaHCO_3 -liuoksella ($3 \cdot 250$ ml) ja kylläisellä NaCl -liuoksella (250 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla (250 ml + 0,1 % TEA). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO_4 :lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuuminjassa. Raakatuotteen saanto oli 2,6 g. Puhdistettiin silikapylväässä (200 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 1000 ml 2 % -, 1000 ml 3 % - ja 1500 ml 4 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Saanto oli 2,0 g (94 %).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) δ 12,04 (s; 1H; N1-H); 11,68 (s; 1H; NH); 8,16 (s; 1H; H8); 6,19 (t; $J=6,4$ Hz; 1H; H1'); 5,43 (d; $J=4,2$; 1H; 3'-OH); 4,41 (m; 1H; H3'); 3,90 (m; 1H; H4'); 3,80 (m; 1H; as. *t*-CH); 3,58 (dd; $J=4,0$; 10,6 Hz; H5'); 3,48 (dd; $J=4,9$; 10,6 Hz; H5''); 2,78 (m; 2H; *t*-CH); 2,63 (m; 1H; H2'); 2,33 (m; 1H; H2''); 1,250 ja 1,245 (s; 6H; $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,12 (d; $J=6,8$ Hz; 6H; *i*-Bu $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 0,99 ja 0,97 (d; $J=6,5$ Hz; 6H; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) δ 180,00 (*i*-Bu C=O); 154,75 (C6); 148,42 (C4); 147,95 (C2); 137,35 (C8); 120,17 (C5); 99,80 (as. O-C-O); 85,80 (C4'); 82,69 (C1'); 70,38 (C3'); 62,39 (as. *t*-C); 61,00 (C5'); 39,21 (C2'); 34,69 (*t*-C); 25,56 ja 25,51 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 24,18 ja 24,15 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 18,84 ja 18,79 (*i*-Bu $\text{C}(\text{CH}_3)_2$)

(ESI⁺)-TOF-MS: laskennallinen m/z molekyylikaavalle $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 438,2347; havaittu 438,2336

8.5.3 *N*⁴-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-*O*-(2-isopropoksipropan-2-yl)sytidiini



*N*⁴-bentsoyyli-3'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-

2'-deoksi-5'-*O*-(2-isopropoksipropan-2-yl)sytidiini **15** (4,4 g, 8,0 mmol) ja TBAF (4,2 g, 16,0 mmol) liuotettiin THF:iin (61 ml). Annettiin reagoida huoneenlämmössä 1,5 h. Reaktioseos laimennettiin DCM:lla (500 ml + 0,1 % TEA) ja uutettiin kylläisellä NaHCO_3 -liuoksella (3 · 300 ml) ja kylläisellä NaCl -liuoksella (300 ml). Takaisin uutettiin DCM:lla

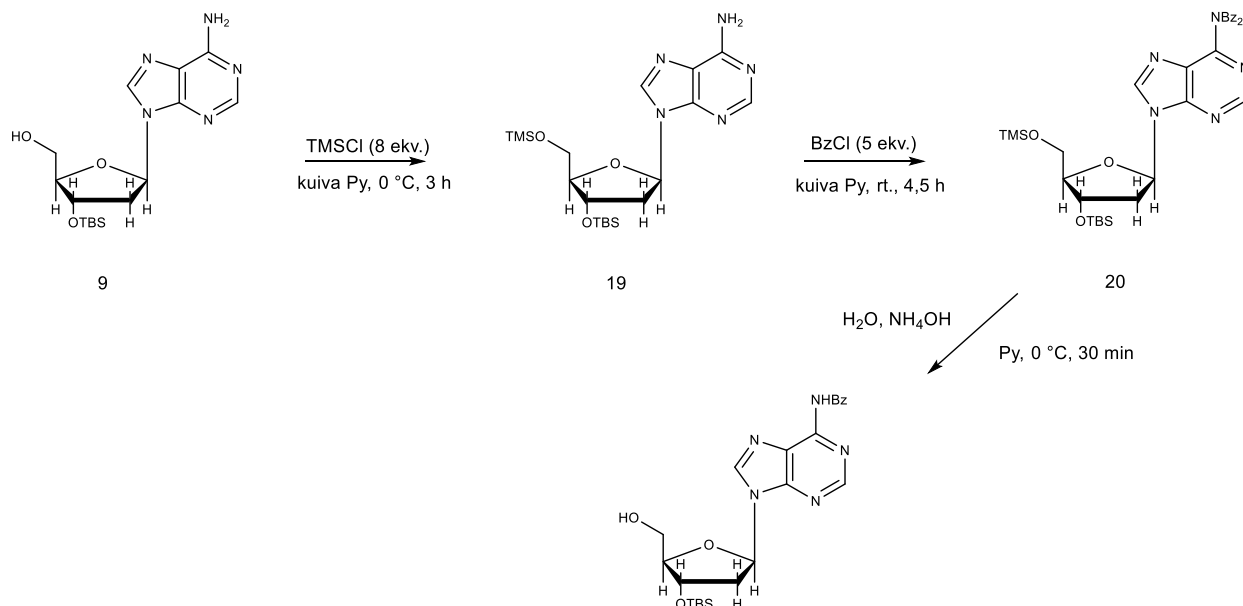
(200 ml + 0,1 % TEA). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO_4 :lla. Liuotin haihdutettiin ja jäännös kuivattiin vakuuminlinjassa. Raakatuotteen saanto oli 2,6 g. Puhdistettiin silikapylväässä (500 ml silikageeliä). Ajoliuoksina oli 1000 ml 2 % - ja 3500 ml 3 % MeOH/DCM + 0,1 % TEA. Saanto oli 1,4 g (53 %).

^1H -NMR (400 MHz; DMSO- d_6) δ 11,24 (s; 1H; NH); 8,34 (d; $J=7,4$ Hz; 1H; H6); 8,01 (d; $J=7,4$ Hz; 2H; Bz-*o*); 7,62 (t; $J=7,2$ Hz; 1H; Bz-*p*); 7,51 (t; $J=7,7$ Hz; 2H; Bz-*m*); 7,37 (d; 1H; H5); 6,14 (t; $J=6,0$ Hz; 1H; H1'); 5,37 (d; $J=4,5$; 1H; 3'-OH); 4,23 (m; 1H; H3'); 4,00-3,90 (m; 2H; H4' ja as. *t*-CH); 3,63 (dd; $J=3,4$ Hz, 10,7 Hz; 1H; H5'); 3,62 (dd; $J=3,4$; 10,8 Hz; 1H; H5''); 2,34 (m; 1H; H2'); 2,12 (m; 1H; H2''); 1,33 ja 1,32 (s; H6; as. $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,09 ja 1,08 (d; $J=6,1$ Hz; 6H; as. $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)

^{13}C -NMR (125 MHz; DMSO- d_6) δ 167,33 (Bz-C=O); 162,93 (C4); 154,23 (C2); 144,72 (C6); 133,15 (Bz-*p*); 132,68 (Bz); 128,40 (Bz-*o* ja Bz-*m*); 100,00 (as. O-C-O); 95,77 (C5); 86,10 (C1'); 86,02 (C4'); 69,85 (C3'); 62,73 (as. *t*-C); 60,45 (C5'); 40,81 (C2'); 25,53 ja 25,49 (as. $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$); 24,31 ja 24,27 (as. $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$)

(ESI⁺)-TOF-MS: laskennallinen m/z molekyylikaavalle $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 432,2129; havaittu 432,2134

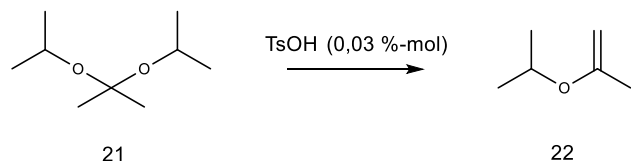
8.6 3'-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiinin N⁶:n suojaaminen bentsoyylikloridilla



10

3'-O-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-2'-deoksiadenosiini **9** (0,3 g, 0,7 mmol) ja TMSCl (0,5 ml, 3,7 mmol) liuotettiin kuivaan pyridiiniin argonatmosfäärissä. Annettiin reagoida 2,5 h 0 °C:ssa. Lisättiin TMSCl (0,3 ml, 2,4 mmol) ja annettiin reagoida vielä 30 min. Lisättiin BzCl (0,5 g, 3,7 mmol) ja annettiin reagoida 4,5 h huoneenlämmössä. Lisättiin vesi (3 ml) ja annettiin reagoida 15 min 0 °C:ssa. Lisättiin 15 M ammoniakki (3 ml) ja annettiin reagoida vielä 15 min 0 °C:ssa. Haihdutettiin öljyksi. Laimennettiin vedellä (100 ml) ja lisättiin 40 ml dietyylieetteriä. Eetterifaasi erotettiin ja pidettiin 16 h -18 °C:ssa. Muodostuneet kiteet suodatettiin ja kuivattiin vakuumilinjassa. Saanto oli 0,2 g (69 %).

8.7 2-isopropyylioksispropeeni



2,2-di-isopropyylioksispropaani **21** (41,0 g, 0,26 mol) ja TsOH (15 mg, 8 mmol) yhdistettiin ja tislattiin kuivalla laitteistolla argonatmosfäärissä. Tisle uutettiin 10 % NaHCO₃-liuoksella (3 · 20 ml) Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla. Tislattiin uudelleen samalla laitteistolla argonatmosfäärissä ja kerättiin fraktioita. Tuotteen kp. n. 75-85 °C. Saanto 14,8 g (36 %).

¹H-NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 4,23 (m; 2H; isoprop. CH); 3,87 (d; 1H; C=CH₂’); 3,80 (d; 1H; C=CH₂’); 1,78 (s; H₃; propeeni CH₃); 1,23 (d; *J*=6,1 Hz; 6H; isoprop. CH₃)

8.8 Fosfomolybdeenihapon (PMA) kidevesien ja vesipitoisuuden määrittäminen NMR-spektristä

PMA-näyte (103,3 mg) punnittiin NMR-putkeen. Lisättiin THF:a (46 µl, 0,57 mmol) sisäiseksi standardiksi. Liuotettiin deuteroituun metanoliin (1,0 ml) ja ajettiin ¹H-NMR-spektri. Integroitiin THF-(1,000) ja H₂O-signaalit (1,515). THF:n ja H₂O:n ainemääristä ja signaalivasteista saatiin verranto, josta H₂O:n ainemäärä (1,727 mmol) ja massa (31,1 mg) voitiin laskea. Voitiin laskea massa kuivalle PMA:lle (72,2 mg) ja moolimassan (1825 g/mol) avulla ainemäärä (0,0396 mmol). Nyt voitiin laskea veden määrä (43,6 kpl) yhtä PMA-molekyyliä kohden, jolloin PMA:n todelliseksi moolimassaksi saatiin M(PMA + 44 H₂O) = 2618 g/mol.

Viiteluettelo

- 1 K. K. Ogilvie, S. L. Beaucage, A. L. Schiffman, N. Y. Theriault ja K. L. Sadana, *Canadian Journal of Chemistry*, 1978, **56**, 2768.
- 2 D. M. Brown, D. I. Magrath, A. H. Neilson ja A. R. Todd, *Nature*, 1956, **177**, 1124.
- 3 C. B. Reese, *Tetrahedron*, 1978, **34**, 3143.
- 4 B. E. Griffin, M. Jarman ja C. B. Reese, *Tetrahedron*, 1968, **24**, 639.
- 5 K. K. Ogilvie, K. L. Sadana, E. A. Thompson, M. A. Quilliam ja J. B. Westmore, *Tetrahedron Lett.*, 1974, **15**, 2861.
- 6 K. K. Ogilvie, N. Usman, K. Nicoghossian ja R. J. Cedergren, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1988, **85**, 5764.
- 7 R. L. Letsinger ja K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 4801.
- 8 S. Pitsch, *Helv. Chim. Acta*, 1997, **80**, 2286.
- 9 J. Smrt, *Tetrahedron Lett.*, 1967, **8**, 3133.
- 10 D. C. Capaldi ja C. B. Reese, *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**, 2209.
- 11 S. Matysiak ja W. Pfeleiderer, *Helv. Chim. Acta*, 2001, **84**, 1066.
- 12 C. B. Reese, M. V. Rao, H. T. Serafinowska, E. A. Thompson ja P. S. Yu, *Nucleosides and Nucleotides*, 1991, **10**, 81.
- 13 B. Liu ja S. Thayumanavan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 2306.
- 14 J. Clayden, N. Greeves ja S. G. Warren, *Organic chemistry*, Oxford University Press, Oxford; New York, 2. p., 2012, s. 223–226.
- 15 A. M. Wenthe ja E. H. Cordes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 3173.
- 16 E. H. Cordes ja H. G. Bull, *Chem. Rev.*, 1974, **74**, 581.
- 17 W. E. Parham ja E. L. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 4187.
- 18 C. B. Reese, R. Saffhill ja J. E. Sulston, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 3366.

- 19 C. B. Reese, R. Saffhill ja J. E. Sulston, *Tetrahedron*, 1970, **26**, 1023.
- 20 M. M. Kreevoy ja R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 3146.
- 21 D. G. Norman, C. B. Reese ja H. T. Serafinowska, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 3015.
- 22 J. G. Lackey, D. Mitra, M. M. Somoza, F. Cerrina ja M. J. Damha, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 8496.
- 23 C. Christodoulou, S. Agrawal ja M. J. Gait, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 1521.
- 24 T. H. Fife, *Acc. Chem. Res.*, 1972, **5**, 264.
- 25 A. Sandström, M. Kwiatkowski ja J. Chattopadhyaya, *Acta chemica Scandinavica. Series B: Organic chemistry and biochemistry*, 1985, **39**, 273.
- 26 M. E. Schwartz, R. R. Breaker, G. T. Asteriadis, J. S. deBear ja G. R. Gough, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1992, **2**, 1019.
- 27 S. L. Beaucage ja R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 2223.
- 28 A. H. Krotz, B. McElroy, A. N. Scozzari, D. L. Cole ja V. T. Ravikumar, *Organic Process Research and Development*, 2003, **7**, 47.
- 29 M. A. Russell, A. P. Laws, J. H. Atherton ja M. I. Page, *Organic & biomolecular chemistry*, 2009, **7**, 52.
- 30 M. Septak, *Nucleic Acids Res.*, 1996, **24**, 3053.
- 31 B. S. Sproat ja W. Bannwarth, *Tetrahedron Lett.*, 1983, **24**, 5771.
- 32 S. P. Adams, K. S. Kavka, E. J. Wykes, S. B. Holder ja G. R. Galluppi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 661.
- 33 Z. S. Cheruvallath, R. L. Carty, M. N. Moore, D. C. Capaldi, A. H. Krotz, P. D. Wheeler, B. J. Turney, S. R. Craig, H. J. Gaus, A. N. Scozzari, D. L. Cole ja V. T. Ravikumar, *Organic Process Research and Development*, 2000, **4**, 199.
- 34 C. H. Paul ja A. T. Royappa, *Nucleic Acids Res.*, 1996, **24**, 3048.
- 35 M. H. Baik, R. A. Friesner ja S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 4495.
- 36 A. G. Molina, V. Kungurtsev, P. Virta ja H. Lönnberg, *Molecules*, 2012, **17**, 12102.
- 37 Z. Liang, H. Koivikko, M. Oivanen ja P. Heinonen, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2019, **15**, 746.

- 38 R. S. Juvet and J. Chu, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 1560.
- 39 H. Lateef ja S. T. Mullins, 2000, **104**, 167.
- 40 J. Smrt, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1968, **33**, 2470.
- 41 J. H. van Boom, P. van Deursen, J. Meeuwse ja C. B. Reese, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1972, , 766.
- 42 K. B. Mullis, U.S. Pat., 4 683 202, 1987.
- 43 I. Koukhareva ja A. Lebedev, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 4955.
- 44 T. Rodríguez-Pérez, S. Fernández, S. Martínez-Montero, T. González-García, Y. S. Sanghvi, V. Gotor ja M. Ferrero, *European Journal of Organic Chemistry*, 2010, **2010**, 1736.
- 45 B. E. Griffin, M. Jarman, C. B. Reese ja J. E. Sulston, *Tetrahedron*, 1967, **23**, 2301.
- 46 A. Hampton, J. C. Fratantoni, P. M. Carroll ja S. C. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 5481.
- 47 Y. Palom, E. Alazzouzi, F. Gordillo, A. Grandas ja E. Pedroso, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 2195.
- 48 H. S. Huang, R. Kong, X. A. Xheng, W. J. Chen, S. B. Han, D. Y. Zeng, S. S. Gong ja Q. Sun, *Synlett*, 2018, **29**, 2437.
- 49 X. F. Zhu, H. J. Williams ja A. I. Scott, *Synthetic Communications*, 2003, **33**, 2011.